DOI:10.16016/j.2097-0927.202108210

驱动蛋白家族成员 5A 介导的溶酶体功能在镉神经毒性中的作用

邓 平,陈梦妍,谢 佳,田 丽,余争平,皮会丰 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)军事预防医学系军队劳动卫生学教研室,电磁辐射医学防护教育部重点实验室

[**摘要**] **目的** 探讨驱动蛋白家族成员 5A(kinesin family member 5A,KIF5A)介导的溶酶体功能损伤在镉神经毒性中的作用。**方法** 以原代培养的 SPF 级 C57BL/6J 小鼠皮层神经元为模型,分为对照组和镉暴露组。检测氯化镉暴露 24 h 后皮层神经元的半数抑制浓度(IC_{50})。进一步用 1、2、3 μmol/L 氯化镉处理神经元 24 h,检测细胞存活率、神经元分化和溶酶体功能。RT-qPCR 和 Western blot 检测 KIF5A mRNA 和蛋白的表达。腺病毒过表达 KIF5A 检测镉暴露后神经元的溶酶体功能、分化及细胞存活率。**结果** 神经元暴露氯化镉 24 h 的半数抑制浓度 IC_{50} 为 2.9 μmol/L。与对照组相比,2、3 μmol/L 镉暴露 24 h 后神经元细胞活力受到抑制($P<0.01$),突起生长的总长度和分枝点数目显著减少($P<0.01$)。此外,与对照组相比,2、3 μmol/L 氯化镉处理后显著抑制神经元溶酶体组织蛋白酶 B(cathepsin B,CTSB)的活性和改变其酸性环境($P<0.01$),但是对组织蛋白酶 D(cathepsin D,CTSD)活性没有影响。镉暴露后 KIF5A 的 mRNA 及蛋白表达显著降低($P<0.01$)。过表达 KIF5A 可以显著改善镉暴露对神经元组织蛋白酶活性 CTSB 的抑制、稳定镉暴露造成的溶酶体 pH 值改变,拮抗镉暴露对神经元细胞活力及突起生长的抑制作用($P<0.01$)。**结论** 镉暴露显著减少神经元中 KIF5A 蛋白的表达,从而损伤溶酶体功能,抑制神经元细胞活力及突起生长。

[**关键词**] 氯化镉;神经毒性;KIF5A;溶酶体功能
[**中图法分类号**] R341; R992; R995 [**文献标志码**] A

Effect of KIF5A mediated lysosomal functions in cadmium exposure-induced neurotoxicity *in vitro*

DENG Ping, CHEN Menyan, XIE Jia, TIAN Li, YU Zhengping, PI Huifeng Department of Occupational Health, Key Laboratory of Electromagnetic Radiation Protection of Ministry of Education, Faculty of Military Preventive Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of kinesin family member 5A (KIF5A) mediated lysosomal functions in cadmium (Cd) exposure-induced neurotoxicity. **Methods** Primary cortical neurons isolated and primarily cultured from specific pathogen free (SPF) C57BL/6J mice were used and divided into control and Cd-exposed groups. The 50% inhibitory concentration (IC_{50}) of cortical neurons after 24 h of Cd exposure was measured. Furthermore, the neurons were treated with 1, 2 and 3 μmol/L cadmium chloride ($CdCl_2$) for 24 h, and then cell viability, neuronal differentiation and lysosomal function were measured. RT-qPCR and Western blotting were used to detect the changes of KIF5A expression at mRNA and protein levels. The effects of overexpression of KIF5A by adenoviral vector on cell viability, neuronal differentiation and lysosomal function were also investigated in the Cd-exposed cortical neurons. **Results** The IC_{50} value in neurons exposure to $CdCl_2$ for 24 h was determined to be 2.9 μmol/L. Compared with the control group, the cell viability was inhibited ($P<0.01$) and the total length of protrusion growth and the number of branching

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(82173473, 81872596)
[**通信作者**] 皮会丰,E-mail:pihuifeng2010@163.com

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

points were obviously reduced ($P<0.01$) after 2 and 3 μmol/L $CdCl_2$ exposure for 24 h. In addition, 2 and 3 μmol/L $CdCl_2$ treatment also resulted in dramatically decreased lysosomal activity of cathepsin B (CTSB) and altered acidic environment when compared with the control group ($P<0.01$). However, the activity cathepsin D(CTSD) was not significantly changed in $CdCl_2$-exposed neuronal cells. More importantly, the mRNA and protein levels of KIF5A were remarkably decreased after Cd exposure ($P<0.01$). Overexpression of KIF5A effectively increased the CTSB activity, stabilized the lysosomal pH value, and antagonized the inhibitory effect on cell viability and protrusion growth induced by Cd exposure ($P<0.01$). **Conclusion** Cd exposure significantly reduces KIF5A protein expression in neurons, and thereby impairs lysosomal function and inhibits neuronal cell viability and protrusion growth.

[**Key words**] $CdCl_2$; neurotoxicity; kinesin family member 5A; lysosomal function

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (82173473, 81872596). Corresponding author: PI Huifeng, E-mail: pihuifeng2010@163.com

重金属镉被广泛应用于电镀、化工、电池生产等多个领域。自日本富山县人群因食用镉污染的稻米和鱼虾等出现痛痛病(Itai-Itai Disease)以来,镉中毒机制及其防治引起了世界各国的高度关注。我国镉污染现状同样十分严峻,2018 年《环境科学》报道中国粮食主产区耕地土壤重金属点位超标率为 21.49%,且镉污染耕地点位超标率(17.39%)位列第一[1]。镉是多系统、多器官毒物[2],神经系统是镉毒理作用的主要靶器官之一。多项人群流行病学调查显示镉暴露会损伤认知功能[3-4]。研究表明,镉暴露会抑制小鼠海马区神经发生和神经元凋亡,从而损伤小鼠的认知和嗅觉记忆[5]。因此探究镉诱导神经系统损伤的分子机制,可以为镉的神经毒性防护提供新线索。

溶酶体功能障碍是镉对中枢神经系统损伤的重要机制。溶酶体是神经元内物质代谢的主要场所,某些衰老细胞器和生物大分子等陷入溶酶体内并被消化掉是维持神经元稳态的关键因素之一[6]。溶酶体受损会导致细胞凋亡因子的释放、细胞自噬障碍,造成神经元的损伤或者促使神经元死亡[7]。因此,维持溶酶体的正常功能对神经元生命活动是至关重要的。我们前期研究结果显示,神经细胞(Neuro-2a 细胞)在镉暴露后会出现溶酶体标志蛋白 LAMP1 的减少,溶酶体的 pH 值改变,溶酶体的水解酶活性降低,能量代谢障碍进而促进神经细胞死亡,提示溶酶体功能损伤是镉神经毒性的重要机制[8-9]。然而,镉是通过哪些信号通路损伤溶酶体功能,有待于进一步阐明。

KIF5A 即驱动蛋白家庭成员 5A(kinesin family member 5A),是一种基于微管的运动蛋白,参与细胞内细胞器、蛋白质等大分子物质的运输。KIF5A 蛋白在维持神经元的活力和可塑性及相关神经系统疾病的发生发展中都发挥着重要的作用。最近研究也表明 KIF5A 对于维持神经元溶酶体的正常功能也有重要意义[10-11]。本研究通过体外实验,以原代培养的 SPF 级 C57BL/6J 小鼠皮层神经元为模型,初步探究 KIF5A 介导的溶酶体功能在镉神经毒性中的作用。

1 材料与方法

1.1 细胞培养及氯化镉暴露方式

根据我们前期建立的方法[11],在体式显微镜下从 C57BL/6J 新生小鼠(P0~P1)中分离培养原代皮层神经元。分离的神经元在聚 L-赖氨酸(Sigma-Aldrich 公司)包被过的培养皿中培养。接种培养基为:DMEM/F-12 培养基(Gibco 公司)含 10% FBS、10% 马血清(Gibco 公司)和 1%青霉素及链霉素,在 5% CO_2 加湿环境中 37 ℃培养 24 h 后,培养基更换为 Neurobasal-A 培养基(Gibco 公司),并补充 2% B-27(Gibco 公司)和 0.5% GlutaMAX(Gibco 公司)。神经元培养 7 d 后,用氯化镉处理原代皮层神经元 24 h。氯化镉购自 Sigma 公司,纯度>99.99%。以 PBS 配制氯化镉储液,浓度为 100 mmol/L,以培养基稀释至 1~7 μmol/L 使用。

C57BL/6J 新生小鼠(P0~P1)由陆军军医大学实验动物中心提供,生产许可证号 SCXK(渝)20170002,使用许可证号 SYXK(渝)20170002。动物实验获得陆军军医大学实验动物伦理审查委员会批准(AMUWEC2019493)。

1.2 CCK-8 细胞增殖实验

使用细胞增殖-毒性检测试剂盒(CCK-8,Dojindo 公司)测定细胞增殖能力。将小鼠皮层神经元细胞以 2×10^4/孔接种于 96 孔细胞培养板,培养 7 d 后,用含不同剂量氯化镉的培养基处理 24 h,通过酶标仪在波长 450 nm 处测量光密度值[D(450)]。

1.3 神经元突起生长分析实验

将小鼠皮层神经元细胞以 1×10^4/孔接种于 96 孔细胞培养板,培养 7 d 后,分别用含 1、2、3 μmol/L 氯化镉培养基处理细胞。将培养板放入 IncuCyte ZOOM

(Essen BioScience 公司,美国)装置中培养。IncuCyte 每 8 小时记录 1 次细胞图像,持续 24 h。利用 IncuCyte ZOOM NeuroTrack 分析系统分析神经元突起生长,参考课题组前期建立的方法[12]分析镉暴露对其突出长度及分枝点数量的影响。

1.4 组织蛋白酶 B(cathepsin B,CTSB)和组织蛋白酶 D(cathepsin D, CTSD)活性检测

将小鼠皮层神经元细胞以 2×10^6/孔接种于 6 孔板,培养 7 d 后,分别用含 1、2、3 μmol/L 氯化镉培养基处理细胞 24 h。分别采用 CTSB 和 CTSD 活性荧光检测试剂盒(BioVision 公司,K143-100,K140-100)检测镉处理对神经元组织蛋白酶活性的影响,使用 Infinite™ M200 多功能酶标仪分别读取 400 nm 激发和 505 nm 发射的荧光值(CTSB)及 328 nm 激发和 460 nm 发射的荧光值(CTSD)。分别以蛋白浓度标化 CTSB 或 CTSD 活性[7]。

1.5 神经元溶酶体 pH 检测

根据课题组之前的方法[9]测量神经元溶酶体 pH 值。将小鼠皮层神经元细胞以 2×10^4/孔接种于黑色 96 孔细胞培养板,培养 7 d 后,分别用含 1、2、3 μmol/L 氯化镉培养基处理细胞 24 h。弃去培养基,每孔加入 1 μmol/L LysoSensor Green DND-189 探针(Invitrogen 公司),避光孵育 5 min,再用 PBS 洗涤 3 次,使用 Infinite™ M200 多功能酶标仪读取 485 nm 激发和 530 nm 发射的荧光值。

1.6 神经元溶酶体 LysoTracker™ Red DND-99 染色

根据课题组之前的方法[9]检测神经元溶酶体的免疫荧光。将小鼠皮层神经元细胞以 1×10^6/孔接种于玻璃底共聚焦皿中,培养 7 d 后,分别用含 1、2、3 μmol/L 氯化镉培养基处理细胞 24 h。弃去培养基,每孔加入含 1 μmol/L LysoTracker™ Red DND-99 探针(Invitrogen 公司)的培养基,培养箱中孵育 60 min,使用共聚焦显微镜(Leica TCS SP8,德国)进行拍照及计算。

1.7 实时定量荧光 PCR 分析

以总 RNA 提取试剂 RNAiso Plus(宝生物公司,日本)按说明书步骤提取样本总 RNA。按反转录试剂盒 PrimeScript™ reagent Kit(宝生物公司,日本)说明书步骤将总 RNA 转录为 cDNA。使用荧光定量检测试剂 SYBR Master Mix(宝生物公司,日本)及荧光定量 PCR 仪(CFX96,美国伯乐公司)进行基因实时定量荧光 PCR 分析,检测 KIF5A mRNA 在不同样本中的表达。特异性引物序列见表 1。以 GAPDH 为内参,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算 mRNA 表达量[13]。

1.8 Western blot 检测 KIF5A 蛋白表达

分别收集对照组和各镉暴露组细胞样本提取总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。SDS-PAGE 分离,切胶、转膜、封闭。分别加入兔抗小鼠 KIF5A 抗体(1∶1 000,Thermo Fisher Scientific 公司,美国)、小鼠抗小鼠 β-actin 抗体(1∶5 000,Sigma 公司,美国),4 ℃ 孵育过夜;分别加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG(1∶5 000,碧云天公司,中国),山羊抗小鼠 IgG(1∶5 000,碧云天公司,中国)室温摇床孵育 2 h;洗膜,ECL 显色。利用 ChemiDoc XRS+系统和 Image Lab 软件(美国 Bio-Rad 公司)对条带进行成像和灰度值分析。

1.9 腺病毒 KIF5A 过表达实验

采用含过表达载体 KIF5A 的腺病毒(和元生物设计合成)转染神经元,观察过表达 KIF5A 对镉毒性的拮抗作用。将小鼠皮层神经元细胞以 2×10^4/孔接种于 96 孔细胞培养板中,培养 6 d 后,分别用含过表达载体 KIF5A(KIF5A 过表达组)及对照载体(对照组)的腺病毒感染神经元,24 h 后分别用含 3 μmol/L 氯化镉(KIF5A 过表达组+镉处理组和对照+镉处理组)培养基处理细胞 24 h,进行后续检测。

1.10 统计学处理

所有实验至少重复 3 次。采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。组间比较采用 t 检验和单因素方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 氯化镉可显著抑制小鼠原代皮层神经元的细胞活力

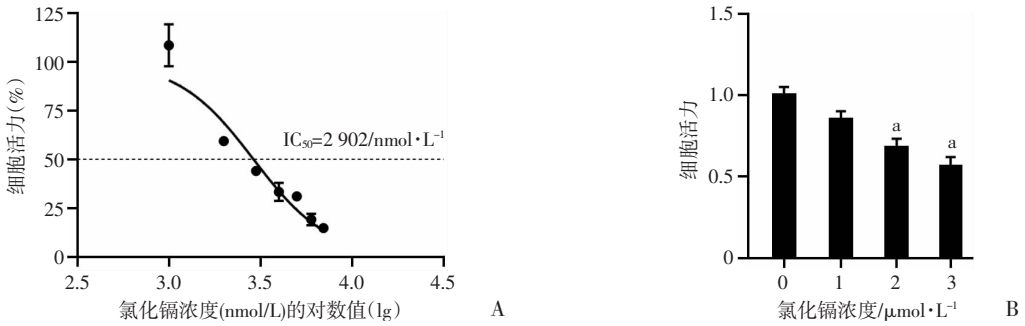
为分析氯化镉暴露对神经元细胞活力造成的影响,以等差梯度测定 1~7 μmol/L 氯化镉暴露小鼠原代皮层神经元 24 h 后,以细胞增殖-毒性检测试剂盒 CCK-8 检测神经元细胞活力变化,计算氯化镉暴露神经元的半数抑制浓度(IC_{50}),结果显示氯化镉 IC_{50} 值为 2.9 μmol/L(图 1A)。据此浓度,应用氯化镉等差梯度浓度 1、2、3 μmol/L 观测氯化镉体外暴露对神经元细胞活力的影响。结果显示,2 μmol/L 和 3 μmol/L 的氯化镉能显著抑制神经元的细胞活力,并呈剂量依赖性特征(图 1B)。

表 1 基因引物序列与长度

基因	上游引物	下游引物	产物长度/bp
KIF5A	5′-CTCACAGCATGAGGCCAAGA-3′	5′-CTCTTCCAGGTGCCGTTTCT-3′	79
GAPDH	5′-AAGGGCATCTTGGGCTACAC-3′	5′-TCGAAGGTGGAAGAGTGGGA-3′	77

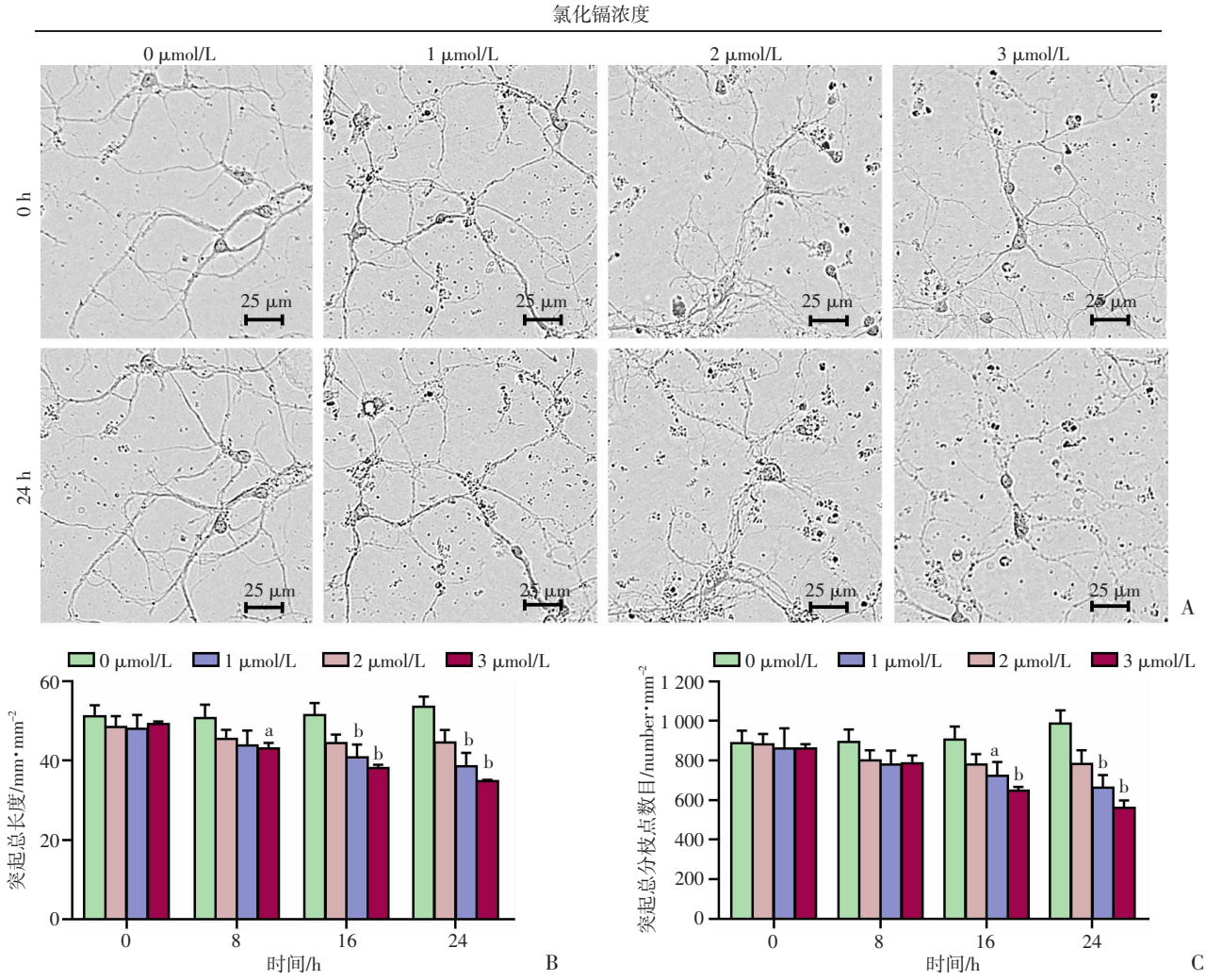
2.2　氯化镉暴露可显著抑制小鼠原代皮层神经元的突起生长

将小鼠皮层神经元置于 IncuCyte ZOOM 装置中培养并分别暴露于 1、2、3 μmol/L 氯化镉,观察及分析氯化镉暴露对神经元突起生长的影响。结果显示,与 0 μmol/L 氯化镉(对照组)相比,2 μmol/L 和 3 μmol/L 氯化镉暴露 24 h 会显著减少神经元突起总长度,并且 3 μmol/L 的氯化镉组在 8 h 神经元突起的总长度已经受到明显抑制。随着处理时间延长,抑制程度加深,并呈现剂量依赖特性(图 2A、B)。此外,神经元突起的分枝点数目也受到明显影响(图 2C),但是统计学差异发生的时间较总长度受抑制发生的时间更长,提示神经元突起的长度可能对镉暴露更为敏感。



A:IC_{50} 分析结果;B:CCK-8 检测细胞活力　a:$P<0.01$,与 0 μmol/L 氯化镉比较

图 1　氯化镉体外暴露对神经元细胞活力的影响



A:IncuCyte ZOOM 观察神经元形态;B、C:神经元突起总长度和分枝点数目分析　a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 0 μmol/L 氯化镉比较

图 2　不同浓度氯化镉体外暴露不同时间抑制神经元神经元突起生长

2.3 氯化镉暴露显著抑制神经元溶酶体的功能

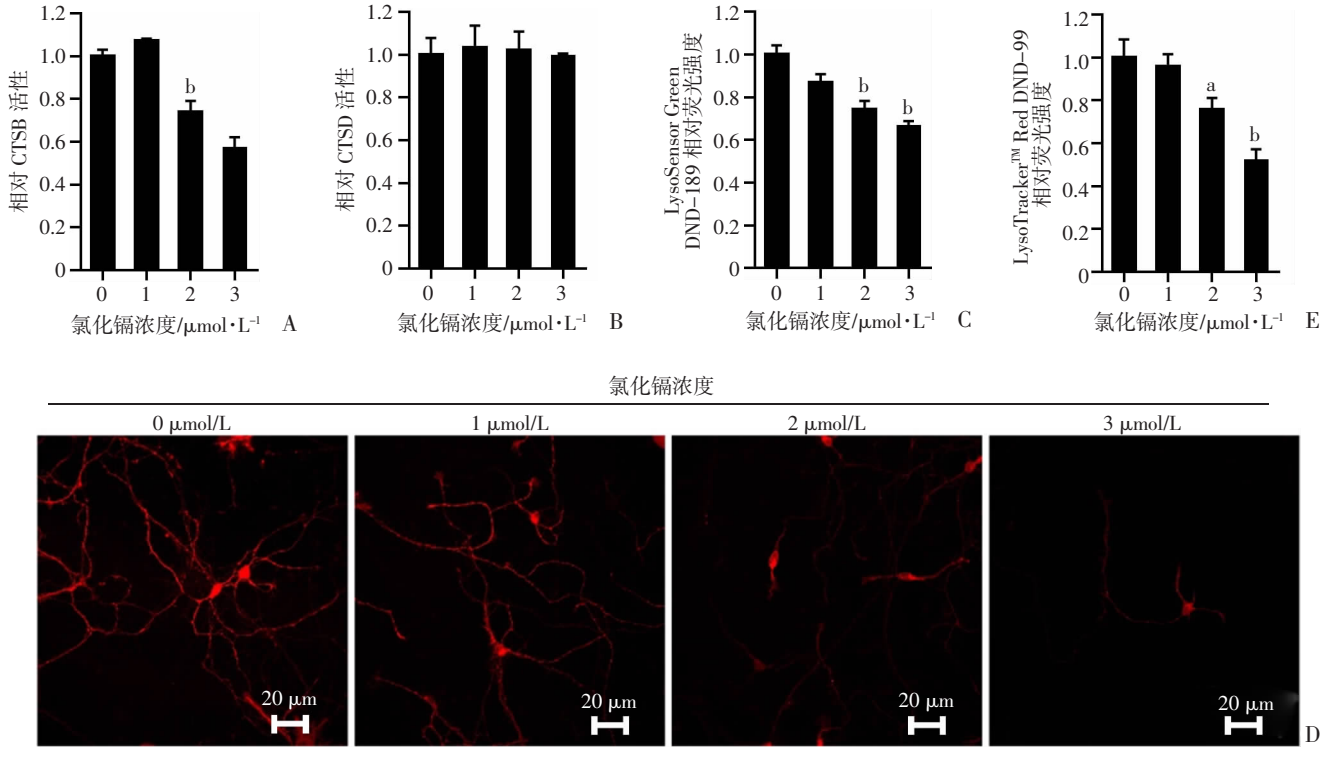
通过测定氯化镉暴露 24 h 对神经元 CTSB 和 CTSD 活性的影响,以判断镉暴露对神经元溶酶体水解功能的影响。结果显示,与 0 μmol/L 氯化镉(对照组)相比,2、3 μmol/L 氯化镉处理显著抑制神经元溶酶体 CTSB 的活性,但是对 CTSD 活性没有影响(图 3A、B)。LysoSensor Green DND-189 探针具有向酸性,能针对性地结合活细胞中的酸性区室,随着细胞器的酸化程度增高其荧光强度越强,常用来反映细胞溶酶体的 pH 值改变情况。与 0 μmol/L 氯化镉(对照组)相比,2、3 μmol/L 氯化镉处理组相对荧光强度显著降低,说明镉暴露后神经元溶酶体 pH 值增高,并呈剂量依赖,提示其酸性环境的丧失(图 3C)。LysoTracker™ Red DND-99 探针免疫荧光检测结果显示,镉暴露显著抑制了该探针的荧光强度,与 Lyso Sensor Green DND-189 检测结果一致(图 3D、E),进一步确定镉暴露可以破坏神经元溶酶体的酸性环境。

2.4 氯化镉暴露可显著抑制神经元 KIF5A mRNA 及蛋白的表达

与 0 μmol/L 氯化镉(对照组)相比,镉暴露神经元 24 h,显著抑制 KIF5A 分子的 mRNA 转录水平并呈剂量依赖特征(图 4A)。此外,经内参校正 Western blot 分析结果显示,镉暴露也显著抑制 KIF5A 的蛋白翻译水平(图 4B、C),提示 KIF5A 的表达减少可能是镉诱导神经元溶酶体功能受损的重要因素。

2.5 过表达 KIF5A 可以显著拮抗氯化镉暴露损伤的神经元溶酶体功能

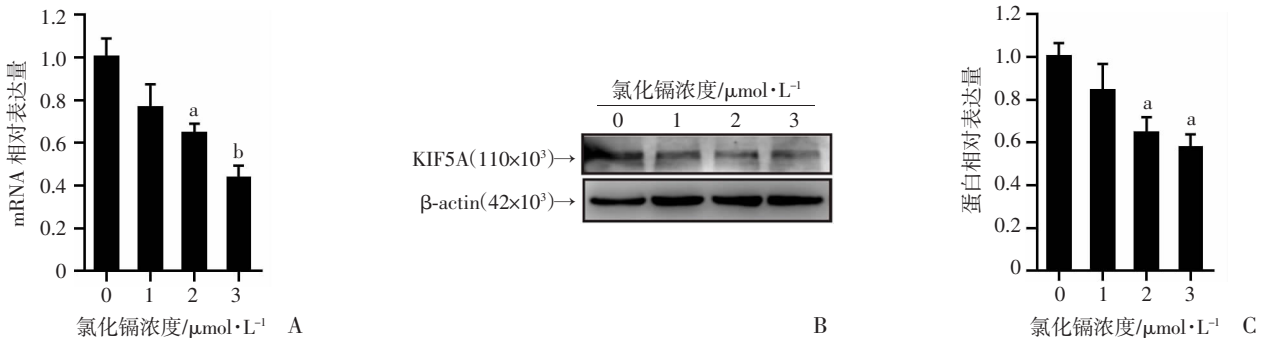
结果显示,含 KIF5A 过表达载体的腺病毒感染神经元可以显著提高 KIF5A 的表达效率(图 5A),而过表达 KIF5A 显著扭转镉暴露对神经元 CTSB 活性的抑制(图 5B)、增高镉暴露后 LysoSensor Green DND-189 和 LysoTracker™ Red DND-99 的相对荧光强度(图 5C~E)。提示过表达 KIF5A 能明显拮抗镉暴露诱导的神经元溶酶体 CTSB 活性的降低和溶酶体酸性环境的破坏。



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 0 μmol/L 氯化镉比较

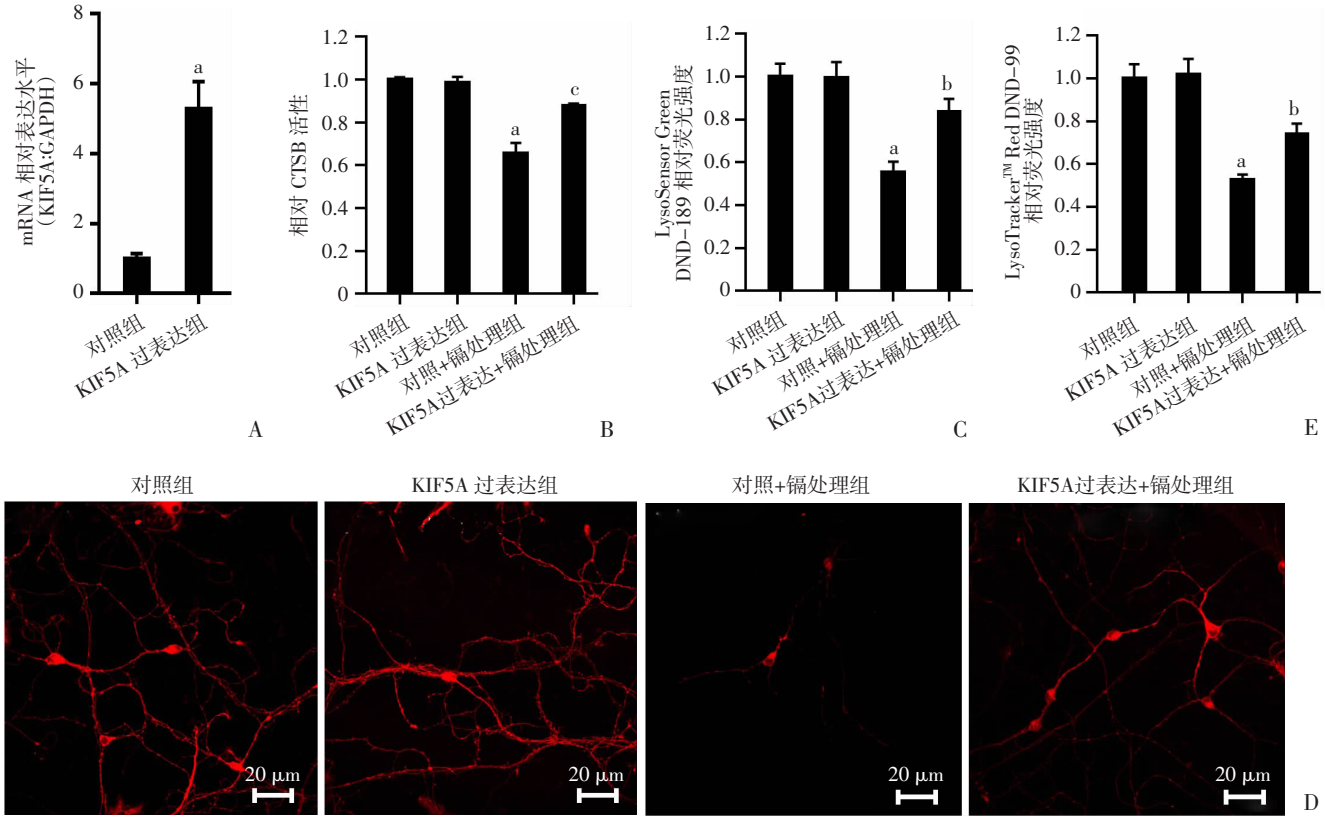
A:CTSB 活性分析结果;B:CTSD 活性分析结果;C:LysoSensor Green DND-189 探针检测结果;D、E:LysoTracker™ Red DND-99 探针检测免疫荧光观察及结果分析

图 3 不同浓度镉暴露 24 h 显著抑制神经元溶酶体功能



A:RT-qPCR 检测 KIF5A mRNA 水平;B:Western blot 检测结果;C:半定量分析　a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 0 μmol/L 氯化镉比较

图 4　镉暴露 24 h 抑制 KIF5A mRNA 和蛋白的表达水平

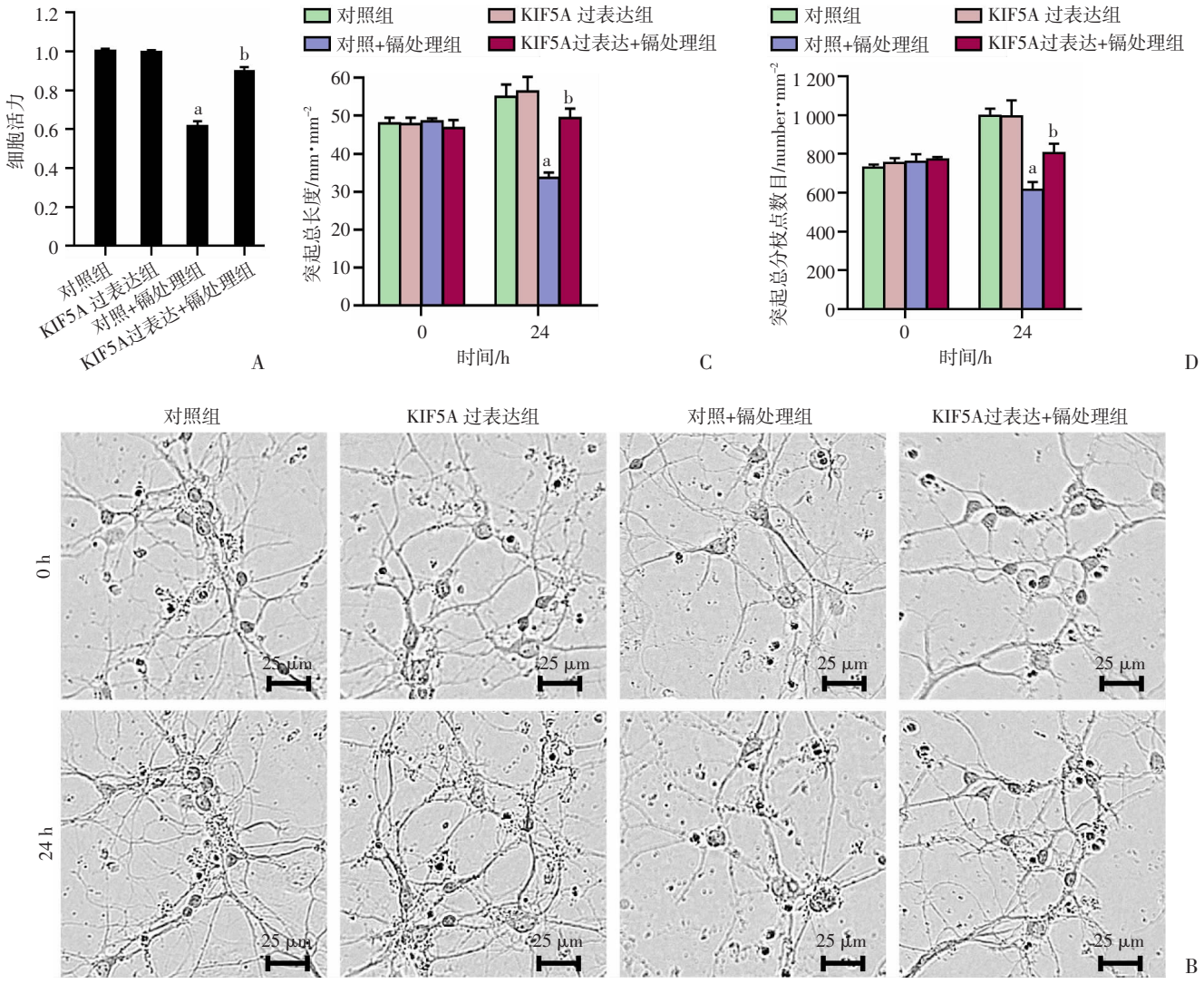


A:KIF5A 过表达效率分析;B:对 CTSB 活性影响分析;C:pH 值影响分析;D、E:LysoTracker™ Red DND-99 探针免疫荧光检测免疫荧光观察与结果分析　a:$P<0.01$,与对照组比较;b:$P<0.05$,c:$P<0.01$,与对照+镉处理组比较

图 5　过表达 KIF5A 能部分改善镉暴露造成的溶酶体功能损伤

2.6　过表达 KIF5A 可以显著改善氯化镉暴露诱导的神经元活力损伤和突起生长抑制

如图 6A 所示,过表达 KIF5A 显著拮抗镉暴露对神经元细胞活力的抑制。同时 IncuCyte ZOOM 检测及分析结果显示,与氯化镉处理组相比,过表达 KIF5A+镉处理组神经元突起生长的总长度更长,分枝点数目更多(图 6B)。提示过表达 KIF5A 可显著改善溶酶体功能,进而拮抗镉暴露对神经元细胞活力和突起生长的抑制。



a:$P<0.01$, 与对照组比较; b:$P<0.01$,与对照+镉处理组比较

A: CCK-8 检测结果;B: IncuCyte ZOOM 观察神经元形态;C、D:神经元突起总长度和分枝点数目分析

图 6 过表达 KIF5A 改善镉暴露对神经元细胞活力及突起生长的抑制

3 讨论

镉可以透过血脑屏障,在脑组织中进行蓄积,并引起一系列的神经症状,包括头痛头晕、帕金森样症状、学习障碍等。虽然镉的神经毒性已经被广泛报道,但是其神经毒理机制仍然不清楚。本研究从 C57BL/6J 新生小鼠(P0~P1)中分离培养原代皮层神经元建立急性镉神经毒性的体外模型,发现该暴露模式下,急性镉暴露显著诱导小鼠神经元溶酶体功能损伤,显著抑制神经元的细胞活力及其分化。同时发现 KIF5A 介导的溶酶体功能与镉神经毒性密切相关。本结果进一步拓展了镉的神经毒理机制。

原代神经元一直被广泛应用于镉神经毒理学的研究。以往研究多关注镉对大鼠原代皮层神经元的影响。WANG 等[13]研究发现 20 μmol/L 镉暴露 SD 大鼠胚胎鼠原代神经元 24 h 后,细胞存活率约为 60%。TANG 等[14]结果则显示 10 μmol/L 镉暴露 SD 大鼠新生鼠原代神经元 24 h 后,细胞活力下降约为 40%。本研究利用 C57BL/6J 新生小鼠(P0~P1)中分离培养原代皮层神经元建立急性镉神经毒性的体外模型,结果显示氯化镉在小鼠原代皮层神经元 IC_{50} 值为 2.9 μmol/L,与大鼠相比,小鼠的神经系统对于镉的敏感性更好,可能是评估镉神经毒性更好的体外模型。

溶酶体被称为细胞中的终末降解站,可动态响应多种细胞程序,特别是自噬[7]。由溶酶体中可溶性水解酶、膜蛋白或辅助蛋白的异常所引起的溶酶体功能

障碍与多种神经病理学有关,例如典型的溶酶体贮积病[15]。溶酶体功能损伤与很多环境污染物的神经毒理机制同样密切相关。ZHI 等[16]研究发现锰暴露的 SK-N-SH 细胞出现溶酶体样结构或酸性囊泡的积累,LAMP1 表达的增加及 CTSD 活性的下降。GU 等[17]研究发现铅暴露会改变溶酶体的 pH 值,溶酶体标志蛋白 LAMP1 下降,进而促进神经细胞死亡。我们前期结果已经在 Neuro-2a 细胞上证实镉可以诱导神经细胞株溶酶体功能损伤[8-9]。本研究在原代神经元模型中的验证结果与此一致,显示镉暴露后抑制神经元溶酶体 CTSB 的活性和改变其酸性环境,进一步明确溶酶体功能损伤在镉神经毒性中的重要作用。

驱动蛋白超家族(kinesin superfamily proteins,KIF)是细胞内重要的马达分子,在细胞内沿着微管转运包括 mRNA、蛋白复合体、细胞器在内的多种货物,对维持细胞的正常功能发挥不可替代的作用[18]。在哺乳动物中,KIF5A 属于 kinesin-1 家族且在神经元中明显高表达。KIF5A 突变与多种神经疾病密切相关,包括肌萎缩侧索硬化、多发性硬化、遗传性运动和感觉神经病以及遗传性痉挛性截瘫等[19]。研究显示,在新生小鼠缺少 KIF5A 基因会直接死亡,而在 KIF5A 条件敲除的小鼠则会出现异常的神经纤维缠结,可表现为颤抖、癫痫、学习记忆功能减退等,表明 KIF5A 对于维持神经元稳态和功能有非常重要的作用[20]。KIF5A 参与运送包括线粒体、溶酶体在内的多种细胞器或分子以维持神经细胞功能。文献[21]报道阿尔兹海默症尸检者的颞叶区会出现 KIF5A 蛋白的减少,β-淀粉样蛋白暴露的原代神经元会出现线粒体轴突转运障碍和线粒体功能损伤。本课题组前期研究发现三甲基氯化锡暴露会抑制 KIF5A 蛋白的表达,从而诱导溶酶体顺向转运障碍,溶酶体功能受损,自噬流受阻,导致神经细胞的死亡[11]。本研究进一步明确镉暴露会抑制 KIF5A 蛋白的表达,过表达 KIF5A 可以显著改善镉暴露对神经元组织蛋白酶活性 CTSB 的抑制、稳定镉暴露造成的溶酶体 pH 值改变、拮抗镉暴露对神经元细胞活力及突起生长的抑制作用,提示 KIF5A 可能是环境重金属神经毒性的共同作用靶点。

本研究也存在以下不足:在模型中通过 LysoTracker™ Red DND-99 染色仅能描述镉暴露显著改变溶酶体的酸性环境,而不能较好地显示镉暴露对溶酶体分布情况及其轴突转运功能的影响。下一步我们将结合活细胞工作站,开展镉暴露对溶酶体的轴突顺向或逆向转运功能影响的相关研究。此外,KIF5A 如何调控溶酶体功能的机制,是否可以直接改变溶酶体 V-ATP 酶的活性亟需深入的探讨。

综上,本研究发现镉暴露诱导神经元分化障碍和细胞死亡,KIF5A 介导的溶酶体功能可能是镉急性神经毒性的重要靶点。揭示镉神经毒理作用的细胞靶点及分子机制,为开展镉神经毒性治疗和药物的研究提供实验依据。

参考文献:

[1] 尚二萍, 许尔琪, 张红旗, 等. 中国粮食主产区耕地土壤重金属时空变化与污染源分析[J]. 环境科学, 2018, 39(10): 4670-4683. DOI: 10.13227/j.hjkx.201802139.
SHANG E P, XU E Q, ZHANG H Q, *et al*. Spatial-temporal trends and pollution source analysis for heavy metal contamination of cultivated soils in five major grain producing regions of China[J]. Environ Sci, 2018, 39(10): 4670-4683. DOI: 10.13227/j.hjkx.201802139.

[2] 邓平, 陈梦妍, 谢佳, 等. 基于基因芯片分析急性镉暴露致大鼠肝损伤及其可能机制[J]. 第三军医大学学报, 2020, 42(16): 1641-1647. DOI: 10.16016/j.1000-5404.202004185.
DENG P, CHEN M Y, XIE J, *et al*. Microarray analysis of the mechanism of liver injury induced by acute cadmium exposure in rats[J]. J Third Mil Med Univ, 2020, 42(16): 1641-1647. DOI: 10.16016/j.1000-5404.202004185.

[3] LIU H, SU L, CHEN X, *et al*. Higher blood cadmium level is associated with greater cognitive decline in rural Chinese adults aged 65 or older[J]. Sci Total Environ, 2021, 756: 144072. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.144072.

[4] PENG Y, LI Z, YANG X, *et al*. Relation between cadmium body burden and cognitive function in older men: a cross-sectional study in China[J]. Chemosphere, 2020, 250: 126535. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.126535.

[5] WANG H, ZHANG L, ABEL G M, *et al*. Cadmium exposure impairs cognition and olfactory memory in male C57BL/6 mice[J]. Toxicol Sci, 2018, 161(1): 87-102. DOI: 10.1093/toxsci/kfx202.

[6] BALLABIO A, BONIFACINO J S. Lysosomes as dynamic regulators of cell and organismal homeostasis[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020, 21(2): 101-118. DOI: 10.1038/s41580-019-0185-4.

[7] YANG Y, KLIONSKY D J. Autophagy and disease: unanswered questions[J]. Cell Death Differ, 2020, 27(3): 858-871. DOI: 10.1038/s41418-019-0480-9.

[8] PI H, LI M, XIE J, *et al*. Transcription factor E3 protects against cadmium-induced apoptosis by maintaining the lysoso-

mal-mitochondrial axis but not autophagic flux in Neuro-2a cells[J]. Toxicol Lett, 2018, 295: 335-350. DOI: 10.1016/j.toxlet.2018.07.015.

[9] LI M, PI H, YANG Z, *et al*. Melatonin antagonizes cadmium-induced neurotoxicity by activating the transcription factor EB-dependent autophagy-lysosome machinery in mouse neuroblastoma cells[J]. J Pineal Res, 2016, 61(3): 353-369. DOI: 10.1111/jpi.12353.

[10] DE PACE R, BRITT D J, MERCURIO J, *et al*. Synaptic vesicle precursors and lysosomes are transported by different mechanisms in the axon of mammalian neurons[J]. Cell Rep, 2020, 31(11): 107775. DOI: 10.1016/j.celrep.2020.107775.

[11] LIU M, PI H, XI Y, *et al*. KIF_5A-dependent axonal transport deficiency disrupts autophagic flux in trimethyltin chloride-induced neurotoxicity[J]. Autophagy, 2021, 17(4): 903-924. DOI: 10.1080/15548627.2020.1739444.

[12] ZHOU C, LIU M, MEI X, *et al*. Histone hypoacetylation contributes to neurotoxicity induced by chronic nickel exposure *in vivo* and *in vitro*[J]. Sci Total Environ, 2021, 783: 147014. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.147014.

[13] WANG Q W, WANG Y, WANG T, *et al*. Cadmium-induced autophagy promotes survival of rat cerebral cortical neurons by activating class Ⅲ phosphoinositide 3-kinase/beclin-1/B-cell lymphoma 2 signaling pathways[J]. Mol Med Rep, 2015, 12(2): 2912-2918. DOI: 10.3892/mmr.2015.3755.

[14] TANG J, DUAN W, DENG P, *et al*. Cadmium disrupts mitochondrial distribution and activates excessive mitochondrial fission by elevating cytosolic calcium independent of MCU-mediated mitochondrial calcium uptake in its neurotoxicity[J]. Toxicology, 2021, 453: 152726. DOI: 10.1016/j.tox.2021.152726.

[15] NORDMANN M, CABRERA M, PERZ A, *et al*. The Mon1-Ccz1 complex is the GEF of the late endosomal Rab7 homolog Ypt7[J]. Curr Biol, 2010, 20(18): 1654-1659. DOI: 10.1016/j.cub.2010.08.002.

[16] 智翠娜, 来丽叶, 窦长松, 等. 溶酶体在锰致 SK-N-SH 细胞毒性中的作用[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2019, 37(5): 332-336. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-9391.2019.05.003.
ZHI C N, LAI L L, DOU C S, *et al*. The role of lysosomes in manganese-induced toxicity in SK-N-SH cells[J]. Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi, 2019, 37(5): 332-336. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-9391.2019.05.003.

[17] GU X, HAN M, DU Y, *et al*. Pb disrupts autophagic flux through inhibiting the formation and activity of lysosomes in neural cells[J]. Toxicol *in Vitro*, 2019, 55: 43-50. DOI: 10.1016/j.tiv.2018.11.010.

[18] WINDING M, KELLIHER M T, LU W, *et al*. Role of kinesin-1-based microtubule sliding in Drosophila nervous system development[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016, 113(34): E4985-E4994. DOI: 10.1073/pnas.1522416113.

[19] FERENZ N P, GABLE A, WADSWORTH P. Mitotic functions of kinesin-5[J]. Semin Cell Dev Biol, 2010, 21(3): 255-259. DOI: 10.1016/j.semcdb.2010.01.019.

[20] XIA C H, ROBERTS E A, HER L S, *et al*. Abnormal neurofilament transport caused by targeted disruption of neuronal kinesin heavy chain KIF_5A[J]. J Cell Biol, 2003, 161(1): 55-66. DOI: 10.1083/jcb.200301026.

[21] WANG Q, TIAN J, CHEN H, *et al*. Amyloid beta-mediated KIF_5A deficiency disrupts anterograde axonal mitochondrial movement[J]. Neurobiol Dis, 2019, 127: 410-418. DOI: 10.1016/j.nbd.2019.03.021.

(**收稿**:2021-08-30;**修回**:2021-11-12)

(编辑 王 红)