

p25-CDK5-p53 信号通路在甲醇致人神经母细胞瘤细胞凋亡中的作用

严姣, 陈楠, 李亚妮, 郝乐乐, 刘贺荣, 宋辉

宁夏医科大学公共卫生与管理学院, 宁夏回族自治区 银川 750004

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2019.19353

摘要:

[背景] 职业接触甲醇后可引起中枢神经系统损伤。有研究表明, 在应激或毒性刺激下, 钙激活蛋白酶 (calpain) 使 p35 蛋白转化为 p25 蛋白, 激活钙依赖性蛋白激酶 5 (CDK5), p53 蛋白积聚及磷酸化后出现神经细胞凋亡。甲醇是否可以激活 calpain 从而启动 p25-CDK5-p53 信号通路, 通过经典线粒体途径使神经细胞凋亡, 尚不明确。

[目的] 通过体外实验探究 p25-CDK5-p53 信号通路在甲醇致人神经母细胞瘤细胞 (SK-N-SH 细胞) 凋亡中的作用。

[方法] 采用不同浓度甲醇 (0、250、750、1250 mmol/L, 即对照、低、中、高浓度组) 分别染毒 SK-N-SH 细胞 24 h 后, 采用 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡; 实时荧光定量 PCR 技术检测 *calpain2*、*CDK5*、*p35*、*p25*、*p53* mRNA 表达水平; Western blotting 检测 *calpain2*、*CDK5*、*p35*、*p25*、*p53* 磷酸化蛋白表达水平。

[结果] 对照组及甲醇低、中、高浓度组处理 24 h 后细胞凋亡率分别为 (8.15±1.77)%、(12.06±0.71)%、(13.81±0.67)%、(19.88±2.40)%, 组间差异有统计学意义 ($F=29.05, P<0.01$)。各浓度组 *calpain2*、*CDK5*、*p25*、*p53* mRNA 相对表达水平差异均有统计学意义 ($F=10.02、61.48、28.91、21.12, P<0.01$), 各浓度组 *p35* mRNA 相对表达水平差异无统计学意义 ($F=0.96, P>0.05$)。与对照组相比, 甲醇低、中浓度组 *calpain2*、*CDK5*、*p25* mRNA 相对表达水平差异均无统计学意义 ($P>0.05$), 甲醇中浓度组 *p53* mRNA 相对表达水平升高 ($P<0.01$), 高浓度组 *calpain2*、*CDK5*、*p25*、*p53* mRNA 相对表达水平升高 ($P<0.01$)。各浓度组 *calpain2*、*CDK5*、*p35*、*p25*、*p53* 磷酸化蛋白、*p53* 蛋白相对表达水平差异具有统计学意义 ($F=32.29、17.60、35.02、35.92、93.72、11.00, P<0.05$)。与对照组相比, 低、中、高浓度组 *calpain2*、*CDK5*、*p35*、*p25*、*p53* 磷酸化蛋白相对表达水平升高 ($P<0.05$), 中、高浓度组 *p53* 蛋白相对表达水平升高 ($P<0.05$), 低浓度组 *p53* 蛋白相对表达水平差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

[结论] 甲醇染毒后可使 *calpain2*、*p35*、*p25* 及 *CDK5* 蛋白表达水平增加, *p53* 蛋白积聚及其磷酸化, 和 SK-N-SH 神经细胞凋亡。

关键词: 甲醇; p25-CDK5-p53; 神经毒性; 细胞凋亡

Role of p25-CDK5-p53 signaling pathway in methanol-induced apoptosis of human neuroblastoma cells YAN Jiao, CHEN Nan, LI Ya-ni, HAO Le-le, LIU He-rong, SONG Hui (School of Public Health and Management, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia Hui Autonomous Region 750004, China)

Abstract:

[Background] Occupational exposure to methanol can cause damage to the central nervous system. Studies have shown that calpain can convert p35 into p25, activating calcium-dependent protein kinase 5 (CDK5) and leading to the accumulation and phosphorylation of p53 and the apoptosis of nerve cells. It is unclear whether methanol can activate calpain, initiate the p25-CDK5-p53 signaling pathway, and cause neuronal apoptosis through the classical mitochondrial pathway.

[Objective] This *in vitro* experiment is designed to investigate the role of p25-CDK5-p53 signaling pathway in the apoptosis of human neuroblastoma cells (SK-N-SH cells) induced by methanol.

[Methods] SK-N-SH cells were exposed to 0, 250, 750, and 1250 mmol/L methanol (named control, low, medium, and high concentration groups, respectively) for 24 h. The apoptosis rate was detected with Annexin V-FITC/PI apoptosis kit. The relative mRNA expression levels of *calpain2*, *CDK5*, *p35*, *p25*, and *p53* were measured by real-time fluorescence quantitative PCR.

基金项目

国家自然科学基金 (81560522)

作者简介

严姣 (1995—), 女, 硕士生;
E-mail: yanjiao12067@163.com

通信作者

宋辉, E-mail: songhui_ny@163.com

利益冲突 无申报

收稿日期 2019-05-22

录用日期 2019-10-26

文章编号 2095-9982(2019)12-1150-06

中图分类号 R135

文献标志码 A

引用

严姣, 陈楠, 李亚妮, 等. p25-CDK5-p53 信号通路在甲醇致人神经母细胞瘤细胞凋亡中的作用 [J]. 环境与职业医学, 2019, 36(12): 1150-1155.

本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2019.19353

Funding

This study was funded.

Correspondence to

SONG Hui, E-mail: songhui_ny@163.com

Competing interests None declared

Received 2019-05-22

Accepted 2019-10-26

To cite

YAN Jiao, CHEN Nan, LI Ya-ni, et al. Role of p25-CDK5-p53 signaling pathway in methanol-induced apoptosis of human neuroblastoma cells [J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2019, 36(12): 1150-1155.

Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2019.19353

The protein expression levels of calpain2, CDK5, p25, p35, p53, and phosphorylated p53 were determined by Western blotting.

[Results] After 24 h of methanol exposure, the apoptosis rates of the control, low, medium, and high concentration groups were (8.15±1.77)%, (12.06±0.71)%, (13.81±0.67)%, and (19.88±2.40)%, respectively, and the difference among the four groups was statistically significant ($F=29.05$, $P<0.01$). The difference of relative mRNA expression levels of *calpain2*, *CDK5*, *p25*, and *p53* among the groups were statistically significant ($F=10.02$, 61.48, 28.91, and 21.12, respectively, $P<0.01$), except the relative mRNA expression level of *p35* ($F=0.96$, $P>0.05$). Compared with the control group, the relative mRNA expression levels of *calpain2*, *CDK5*, and *p25* in the low and medium methanol concentration groups were not significantly different ($P>0.05$), the relative mRNA expression level of *p53* in the medium methanol concentration group was increased ($P<0.01$), and the relative mRNA expression levels of *calpain2*, *CDK5*, *p25*, and *p53* in the high concentration group were increased ($P<0.01$). The relative protein expression levels of calpain2, CDK5, p35, p25, phosphorylated p53, and p53 were significantly different among the designed groups ($F=32.29$, 17.60, 35.02, 35.92, 93.72, and 11.00, respectively, $P<0.05$). Compared with the control group, the relative protein expression levels of calpain2, CDK5, p35, p25, and phosphorylated p53 were increased in the low, medium, and high concentration groups ($P<0.05$), the relative protein expression levels of p53 were increased in the medium and high concentration groups ($P<0.05$), and there was no significant difference in the relative protein expression level of p53 between the low concentration group and the control group ($P>0.05$).

[Conclusion] Methanol exposure may increase the expression levels of calpain2, p35, p25, and CDK5 proteins, induce p53 protein accumulation and phosphorylation, and result in the apoptosis of SK-N-SH cells.

Keywords: methanol; p25-CDK5-p53; neurotoxicity; cell apoptosis

甲醇 (CH₃OH) 是醇类中最简单的一种饱和醇, 由于储存、运输方法简便及优良的理化性质, 因此能被广泛应用于医药、农药、电子、化工等行业。大规模生产和使用甲醇的同时会引起职业性甲醇中毒发病率增加, 这为职业人群健康提出了新的挑战。甲醇主要经呼吸道、肠胃道、皮肤进入人体, 进入人体后可迅速分布在身体的各组织中^[1-2], 在体内氧化和排泄速度均缓慢, 故有明显蓄积作用^[3], 甲醇经人体代谢后产生的代谢产物可引起头晕、恶心、呕吐、视线模糊, 严重者甚至出现失明、丧命^[4-5]。

甲醇代谢产物能引起体内酸碱平衡紊乱, 使体内有机酸积聚 (如乳酸), 主要是因为抑制了氧化酶系统作用, 最终导致代谢性酸中毒。甲醇可能诱发机体的氧化应激状态产生毒性^[6], 中枢神经系统症状、眼部损伤以及代谢性酸中毒是其临床主要表现。现阶段国内外对甲醇毒性的研究多集中于眼部损害及代谢性酸中毒。甲醇可引起中枢神经系统抑制、脑单胺类物质的改变^[7], 被认为是一种重要的神经性毒物。关于甲醇的中枢神经系统毒性研究主要集中在甲醇中毒患者的大脑影像学改变方面^[8]。本课题前期研究^[9]发现甲醇吸入对大鼠具有神经毒性, 而中枢神经损伤往往伴有大量神经细胞凋亡, 而有报道表明^[10-11], 各种有害因素引起的中枢神经系统损伤与细胞的线粒体凋亡途径密切相关。

研究发现, 钙依赖性蛋白激酶5 (calcium-dependent kinase 5, CDK5) 处于经典的线粒体凋亡途径上游, 在线粒体形态改变之前就有 CDK5 过度激活^[12]。CDK5 是脯氨酸限定性丝/苏氨酸蛋白激酶, 在全身组织广泛

分布, 其在神经系统中的含量最为丰富。生理情况下 CDK5-p35 蛋白复合物可能参与细胞骨架的生成、神经系统正常发育、突触可塑性调节、认知功能和学习记忆等过程^[13-16]。p35 蛋白在机体受到外界刺激 (如 H₂O₂、脑缺血、氧化应激、P-淀粉样蛋白) 后, 在钙激活蛋白酶 (calpain) 作用下转化为 p25 蛋白, 形成 CDK5-p25 蛋白复合物, 引起 CDK5 的过度激活并诱导 p53 蛋白磷酸化, 过度磷酸化最终引起细胞形态的退变甚至坏死或凋亡等一系列损伤^[17-18]。因此本研究旨在初步探讨甲醇对人神经母细胞瘤细胞 (SK-N-SH 细胞) p25-CDK5-p53 通路的影响, 为进一步研究甲醇神经毒性提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

甲醇 (天津瑞金特, 中国), 胎牛血清 (BioInd, 以色列), MEM 培养基 (上海中桥新舟, 中国), TBST 溶液 (北京海利克思, 中国), *calpain2*、*p25*、*CDK5*、*p35*、*p53* mRNA 引物 (上海捷瑞生物, 中国), *calpain2*、*CDK5*、*p35*、*p25*、*p53* 以及 p53 磷酸化蛋白抗体 (Abcam, 美国), HRP 标记山羊抗兔 IgG (Abbkine, 美国), *GADPH* 内参 (上海基尔顿生物, 中国), 总 RNA 提取试剂盒 (Tiangen, 德国), 反转录试剂盒、实时荧光定量 PCR 试剂盒 (TaKaRa, 日本), 二喹啉甲酸试剂盒 (凯基生物, 中国), Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒 (BestBio, 中国), 荧光显微镜 (Olympus, 日本), 流式细胞仪 (Sysmex, 日本), PCR 扩增仪 (Bio-Rad, 美国)。

1.2 细胞培养与染毒

本课题组前期通过CCK-8法检测SK-N-SH细胞增殖活力^[19],分别用0、250、500、750、1000、1250、1500、1750、2000 mmol/L 甲醇染毒24、48 h,染毒48 h后拟合的线性回归方程为 $\hat{y}=1.10767-0.00047x$, $R^2=0.98$,随着染毒剂量的增加,细胞毒性逐渐增强。通过拟合的回归方程可计算出 IC_{50} 为1292.96 mmol/L,据此本研究选择0、250、750、1250 mmol/L作为染毒剂量。通过染毒不同时间观察细胞活力及状态,最终确定后续实验染毒时间为24 h。

SK-N-SH细胞用完全培养液(10%胎牛血清+89% MEM培养基+1%链霉素/青霉素)重悬,在培养瓶中加入细胞密度为 2×10^5 个/mL的细胞悬液3 mL,37°C、5%CO₂培养箱培养。每2天换液1次,3~4天传代1次。取对数期生长良好的同批次细胞制成细胞密度为 2.5×10^5 个/mL的细胞悬液,分别接种于6孔板中,每组3孔,每孔2 mL。细胞生长24 h后弃培养液,再加入2 mL甲醇浓度分别为0、250、750、1250 mmol/L的培养液,染毒24 h。

1.3 Annexin V-FITC/PI双染法检测细胞凋亡率

染毒24 h后,用胰酶(不含EDTA和酚红)消化细胞,收集细胞于离心管中,1000×g、离心5 min,弃上清,PBS洗涤细胞3次,800×g、离心3 min,将400 μL的1×Annexin结合液、5 μL Annexin V-FITC染色液混匀放于冰上操作,孵育15 min后加入10 μL PI染色液继续孵育5 min,全程均在4°C避光下操作,结束后上流式细胞仪检测,采用FSC Express 5.0软件分析结果。实验重复3次。

1.4 实时荧光定量PCR检测mRNA水平

*calpain2*等相关引物见表1。染毒24 h后,收集细胞,按照试剂盒说明书操作步骤提取总RNA,使用核酸蛋白分析仪检测光密度,并记录 D_{260}/D_{280} (范围为1.8~2.1),计算RNA浓度。用TaKaRa反转录试剂盒将RNA反转录为cDNA,实时荧光定量PCR法检测mRNA水平。PCR反应体系为25 μL,反应条件:95°C预变性30 s;95°C 5 s,60°C 30 s,40个循环;95°C 10 s。反应结束后记录各组的Ct值,利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算mRNA相对水平。

1.5 Western blotting法测定蛋白表达水平

染毒24 h后,PBS洗涤细胞2次,每孔加入裂解液,用刮刀将细胞刮下,收集到EP管中冰上裂解30 min。4°C,12 000×g,离心5 min。取上清液按照二喹啉甲酸

试剂盒说明书测定蛋白浓度。经SDS-PAGE电泳后进行转膜(转至聚偏氟乙烯膜上),室温下用TBST溶液(含5%脱脂奶粉)封闭1.5 h后,在聚偏氟乙烯膜上孵育相应的一抗,4°C过夜,TBST清洗3次,二抗封闭,室温孵育1 h,TBST清洗3次后将显影液均匀涂抹于聚偏氟乙烯膜蛋白条带上,避光孵育5 min,利用凝胶成像系统扫描条带,实验重复3次。采用Image Pro Plus 6.0软件分析灰度值。

表1 实时荧光定量PCR反应引物序列

| 目的基因名称 | 引物序列(5'→3') |
|-----------------|------------------------------|
| <i>calpain2</i> | 正向引物: CATTGCTCCCTCACCTTG |
| | 反向引物: CGTCCAGAAGCTCGCTCC |
| <i>CDK5</i> | 正向引物: AAAAGATTGGGGAAGGCACC |
| | 反向引物: CCAAAGTCAGCTTCTTGTCCG |
| <i>p35</i> | 正向引物: GGTGCTGTCCCTGTCTCCC |
| | 反向引物: GGTGCTGTCCCTGTCTCCC |
| <i>p25</i> | 正向引物: ATGACAAGCAGCGGGAGG |
| | 反向引物: GGTGGAATTGGAGTGAAGACAG |
| <i>p53</i> | 正向引物: GCTGCTCAGATAGCGATGGTC |
| | 反向引物: AGGATGGGCTCCGGTTC |
| <i>GADPH</i> | 正向引物: TCCTGCACCACCACTGCTT |
| | 反向引物: GGGGCCATCCACAGTCTTCT |

1.6 统计学分析

采用SPSS 22.0软件进行统计分析,定量资料符合正态分布,以均数±标准差表示。多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD-t检验法。检验水准 $\alpha=0.05$,双侧检验。

2 结果

2.1 细胞凋亡率

对照组及甲醇低、中、高浓度组在处理24 h后,细胞凋亡率为(8.15±1.77)%、(12.06±0.71)%、(13.81±0.67)%、(19.88±2.40)%,各组间的差异有统计学意义($F=29.05$, $P<0.01$)。

2.2 mRNA表达水平

如图1所示,各浓度组*calpain2*、*CDK5*、*p25*、*p53* mRNA相对表达水平差异均有统计学意义($F=10.02$ 、61.48、28.91、21.12, $P<0.01$),各浓度组*p35* mRNA相对表达水平差异无统计学意义($F=0.96$, $P>0.05$)。与对照组相比,甲醇低、中浓度组*calpain2*、*CDK5*、*p25* mRNA相对表达水平差异均无统计学意义($P>0.05$);甲醇中浓度组*p53* mRNA相对表达水平升高($P<0.01$);甲醇高浓度组*calpain2*、*CDK5*、*p25*、*p53* mRNA相对表达水平升高(均 $P<0.01$)。

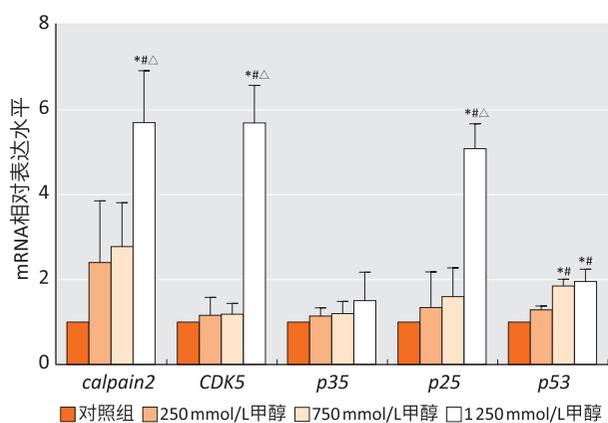
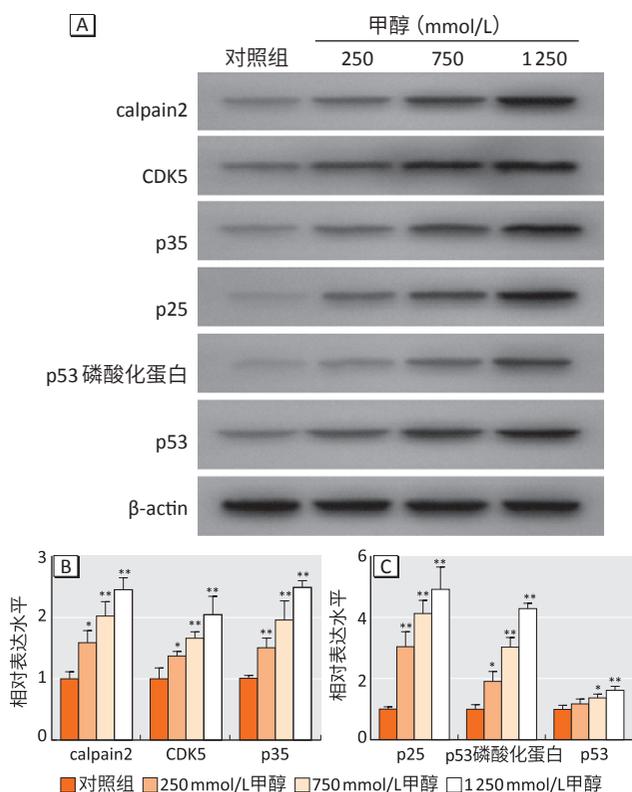


图1 不同甲醇浓度染毒SK-N-SH细胞24h后目的基因mRNA水平

[注] * : 与对照组相比, $P < 0.01$; # : 与低浓度组相比, $P < 0.01$; Δ : 与中浓度组相比, $P < 0.01$ 。

2.3 蛋白表达水平

如图2所示,各浓度组间calpain2、CDK5、p35、p25、p53磷酸化蛋白、p53蛋白相对表达水平的差异具有统计学意义 ($F=32.29、17.60、35.02、35.92、93.72、11.00, P < 0.05$)。与对照组相比,低、中、高浓度组calpain2、CDK5、p35、p25、p53磷酸化蛋白相对表达水平升高 ($P < 0.05$) ;与对照组相比,中、高浓度组p53蛋白相对表达水平升高 ($P < 0.05$) ,低浓度组p53蛋白相对表达水平的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。



[注] A : 电泳条带图, B-C : 蛋白相对表达水平; * : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$ 。

图2 不同浓度甲醇染毒SK-N-SH细胞24h后calpain2、CDK5、p35、p25、p53及p53磷酸化蛋白表达水平

3 讨论

甲醇是最常用的化学性有机溶剂之一,由于对环境造成的危害小,被广泛应用于各个行业,而大量使用甲醇的后果是国内外职业性甲醇中毒事件不断发生^[20-21]。甲醇进入机体后可导致眼部损害、代谢性酸中毒,也可引起神经毒性与细胞凋亡。

细胞凋亡是指在一定的生理或病理情况下,细胞在基因调控下按照自身的程序出现的主动性死亡过程^[22]。近年来,阿尔茨海默氏症和帕金森病患者的脑中已经证实CDK5-p25的表达增加,且对神经细胞进行的实验研究表明CDK5-p25在细胞凋亡中起重要作用^[23]。Miao等^[24]研究发现calpain、p35、p25、CDK5在谷氨酸诱导大鼠视网膜神经元损伤中起重要作用。Tian等^[25]研究发现当脊髓急性缺血再灌注导致神经系统损伤时出现CDK5与p25活性的升高以及脊髓细胞凋亡数量增加。Zhang等^[26]研究发现活化的calpain将p35截断为p25,其导致CDK5-p25复合物的形成和活化,calpain抑制剂主要通过抑制CDK5-p25激活来阻止神经元凋亡。

calpain1和calpain2是主要的存在于中枢神经系统中的钙蛋白酶^[27]。以往研究表明calpain在神经元死亡和神经退行性病变也发挥关键作用^[28]。同时具有神经元特异性的细胞周期蛋白依赖性激酶CDK5能被calpain间接激活,并将p35蛋白水解为p25和p10。与p35相比,p25更容易与CDK5结合并过度激活CDK5,形成CDK5-p25复合物,最终诱导细胞凋亡的途径是通过上调p53并使其磷酸化,激活相关凋亡基因^[29]。其他研究还发现p53在接触外界毒物发生应激时通过激活Ser15和Ser20位点磷酸化调节自身稳态,另外通过独立机制和转录依赖机制诱导其相关的凋亡基因表达,通过相关途径使细胞发生凋亡^[30]。本研究发现甲醇可以诱导SK-N-SH细胞发生凋亡,且随着染毒剂量增加,细胞凋亡率也在上升,甲醇还能够引起神经细胞p25-CDK5-p53通路上的相关因子发生变化。calpain2、CDK5、p25 mRNA及蛋白水平上调,也可使p35蛋白表达增加,同时伴有p53 mRNA、蛋白及p53磷酸化蛋白表达量增加,说明在甲醇染毒SK-N-SH细胞后,会使得p25表达增加,可能造成CDK5过度激活,形成CDK5-p25复合物,上调p53因子的表达及磷酸化从而使得SK-N-SH细胞发生凋亡。目的基因中p35 mRNA相对表达水平没有差异,而其蛋白表达水平有差异,其可能的原因是mRNA与蛋白质在表达时间上

有差异,也有可能是mRNA稳定性较差容易降解,而蛋白降解少导致蛋白积累增多,但还需要在进一步的实验中加以验证。

本研究仅发现甲醇可导致SK-N-SH细胞发生凋亡,p25-CDK5-p53通路相关因子发生变化,但相关因子变化之间的关系以及上调p53表达及磷酸化后如何激活大量凋亡因子从而导致细胞凋亡,还需要进一步的实验研究。

参考文献

- [1] PERKINS RA, WARD KW, POLLACK GM. Methanol inhalation: site and other factors influencing absorption, and an inhalation toxicokinetic model for the rat [J]. *Pharm Res*, 1996, 13 (5): 749-755.
- [2] 吕海辰, 齐曾鑫, 傅晓键, 等. 甲醇中毒大鼠视网膜及肝脏细胞的超微结构改变 [J]. *大连医科大学学报*, 2012, 34 (2): 138-141.
- [3] EELLS JT, HENRY MM, LEWANDOWSKI MF, et al. Development and characterization of a rodent model of methanol-induced retinal and optic nerve toxicity [J]. *Neurotoxicology*, 2000, 21 (3): 321-330.
- [4] KINOSHITA H, IJIRI I, AMENO S, et al. Combined toxicity of methanol and formic acid: two cases of methanol poisoning [J]. *Int J Legal Med*, 1998, 111 (6): 334-335.
- [5] POIRIER SH, KNUTH ML, ANDERSON-BUCHOU CD, et al. Comparative toxicity of methanol and N, N-dimethylformamide to freshwater fish and invertebrates [J]. *Bull Environ Contam Toxicol*, 1986, 37 (1): 615-621.
- [6] KADIISKA MB, MASON RP. Acute methanol intoxication generates free radicals in rats: an ESR spin trapping investigation [J]. *Free Radic Biol Med*, 2000, 28 (7): 1106-1114.
- [7] MACKEY VR, MUTHIAN G, SMITH M, et al. Prenatal exposure to methanol as a dopamine system sensitization model in C57BL/6J mice [J]. *Life Sci*, 2012, 91 (19/20): 921-927.
- [8] GAUGHRAN G, MCCOUBRIE D, BYNEVELT M, et al. Teaching neuroimages: 'Blind drunk': neuroimaging findings in methanol poisoning [J]. *Acta Neurol Belg*, 2016, 116 (4): 637-638.
- [9] 李宣珠, 宋辉, 陈楠, 等. 甲醇28d吸入染毒对雄性大鼠神经行为的损害 [J]. *环境与职业医学*, 2017, 34 (12): 1082-1086.
- [10] VILLENEUVE L, TIEDE LM, MORSEY B, et al. Quantitative proteomics reveals oxygen-dependent changes in neuronal mitochondria affecting function and sensitivity to rotenone [J]. *J Proteome Res*, 2013, 12 (10): 4599-4606.
- [11] DRAGICEVIC N, DELIC V, CAO C, et al. Caffeine increases mitochondrial function and blocks melatonin signaling to mitochondria in Alzheimer's mice and cells [J]. *Neuropharmacology*, 2012, 63 (8): 1368-1379.
- [12] LEE MS, KWON YT, LI M, et al. Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain [J]. *Nature*, 2000, 405 (6784): 360-364.
- [13] CHEUNG ZH, FU AK, IP NY. Synaptic roles of Cdk5: implications in higher cognitive functions and neurodegenerative diseases [J]. *Neuron*, 2006, 50 (1): 13-18.
- [14] JOHANSSON JU, LILJA L, CHEN XL, et al. Cyclin-dependent kinase 5 activators p35 and p39 facilitate formation of functional synapses [J]. *Mol Brain Res*, 2005, 138 (2): 215-227.
- [15] TAN TC, VALOVA VA, MALLADI CS, et al. Cdk5 is essential for synaptic vesicle endocytosis [J]. *Nat Cell Biol*, 2003, 5 (8): 701-710.
- [16] FISCHER A, SANANBENESI F, PANG PT, et al. Opposing roles of transient and prolonged expression of p25 in synaptic plasticity and hippocampus-dependent memory [J]. *Neuron*, 2005, 48 (5): 825-838.
- [17] KO YU, KIM C, LEE J, et al. Site-specific phosphorylation of Fbxw7 by Cdk5/p25 and its resulting decreased stability are linked to glutamate-induced excitotoxicity [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10 (8): 579.
- [18] LAPRESA R, AGULLA J, SÁNCHEZ-MORÁN I, et al. Amyloid- β promotes neurotoxicity by Cdk5-induced p53 stabilization [J]. *Neuropharmacology*, 2019, 146: 19-27.
- [19] 郝乐乐, 宋辉, 陈楠, 等. 甲醇对人神经母细胞瘤细胞增殖及凋亡的影响 [J]. *宁夏医科大学学报*, 2019, 41 (5): 456-460.
- [20] ROSTRUP M, EDWARDS JK, ABUKALISH M, et al. The methanol poisoning outbreaks in Libya 2013 and Kenya 2014 [J]. *PLoS One*, 2016, 11 (3): e0152676.
- [21] BEATTIE M, BEATTIE C, MORRISON ED, et al. Methanol toxicity from occupational exposure: a case report [J]. *Ann Intern Med*, 2019, 171 (2): 143-144.
- [22] 蔡学坚, 王东军, 陈苑新, 等. 大鼠皮质受损区域Cdk5与细胞凋亡的相关性研究 [J]. *中国医学创新*, 2015, 12

- (8) : 16-19.
- [23] CAMINS A, VERDAGUER E, FOLCH J, et al. The role of CDK5/P25 formation/inhibition in neurodegeneration [J]. Drug News Perspect, 2006, 19 (8) : 453.
- [24] MIAO Y, DONG LD, CHEN J, et al. Involvement of calpain/p35-p25/Cdk5/NMDAR signaling pathway in glutamate-induced neurotoxicity in cultured rat retinal neurons [J]. PLoS One, 2012, 7 (8) : e42318.
- [25] TIAN F, XU LH, WANG B, et al. The neuroprotective mechanism of puerarin in the treatment of acute spinal ischemia-reperfusion injury is linked to cyclin-dependent kinase 5 [J]. Neurosci Lett, 2015, 584 : 50-55.
- [26] ZHANG H, CHANG L, ZHANG H, et al. Calpain-2/p35-p25/Cdk5 pathway is involved in the neuronal apoptosis induced by polybrominated diphenyl ether-153 [J]. Toxicol Lett, 2017, 277 : 41-53.
- [27] SUZUKI K, HATA S, KAWABATA Y, et al. Structure, activation, and biology of calpain [J]. Diabetes, 2004, 53 (S1) : S12-S18.
- [28] BAUDRY M, BI X. Calpain-1 and Calpain-2 : the yin and yang of synaptic plasticity and neurodegeneration [J]. Trends Neurosci, 2016, 39 (4) : 235-245.
- [29] MINCHEVA-TASHEVA S, SOLER R M. NF- κ B signaling pathways : role in nervous system physiology and pathology [J]. Neuroscientist, 2013, 19 (2) : 175-194.
- [30] SHARMA S K, CARLSON E C, EBADI M. Neuroprotective actions of Selegiline in inhibiting 1-methyl, 4-phenyl, pyridinium ion (MPP⁺) -induced apoptosis in SK-N-SH neurons [J]. J Neurocytol, 2003, 32 (4) : 329-343.

(英文编辑 : 汪源 ; 编辑 : 陈姣 ; 校对 : 韩凤婵)

(上接第 1149 页)

- cigarette smoke [J]. Cancer Res, 2003, 63 (4) : 793-800.
- [26] 张静, 邓晟, 仲春雪, 等. 香烟烟雾染毒对雄性大鼠睾丸组织一氧化氮水平的影响 [J]. 重庆医学, 2017, 46 (14) : 1885-1888.
- [27] 仲春雪, 何丽娟, 张静, 等. 香烟烟雾暴露对大鼠睾丸超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活力及丙二醛含量的影响 [J]. 环境与健康杂志, 2017, 34 (11) : 982-984.
- [28] 李林林, 张静, 黄云飞, 等. 香烟烟雾对雄性大鼠血清及睾丸组织中一氧化氮 (NO) 含量和一氧化氮合酶 (iNOS) 活性的影响 [J]. 医学动物防制, 2019, 35 (6) : 562-566.
- [29] FILOZOF C, FERNÁNDEZ PINILLA MC, FERNÁNDEZ-CRUZ A. Smoking cessation and weight gain [J]. Obes Rev, 2004, 5 (2) : 95-103.
- [30] MINEUR YS, ABIZAID A, RAO Y, et al. Nicotine decreases food intake through activation of POMC neurons [J]. Science, 2011, 332 (6035) : 1330-1332.
- [31] 张英彪. 苯与甲醛对雄性小鼠生殖毒性的研究 [D]. 衡阳 : 南华大学, 2008.
- [32] 徐宏伟, 马爱国. 维生素A缺乏对大鼠生精能力及睾丸标志酶活性的影响 [J]. 中国公共卫生, 2002, 18 (11) : 1298-1299.
- [33] 刘英姿, 刘浩然, 周源, 等. 山茱萸总皂苷对糖尿病大鼠睾丸病变的改善作用 [J]. 中国现代医学杂志, 2012, 22 (22) : 10-13.
- [34] 杨麦贵, 杨阳, 郝晓柯, 等. 人精液中一氧化氮和 γ -谷氨酰基转移酶活性的关系 [J]. 第四军医大学学报, 2004, 25 (16) : 1516-1518.
- [35] 张作涛, 谢高宇, 陈凯, 等. 腺嘌呤致大鼠睾丸损伤标志酶的变化及淫羊藿总黄酮的干预作用 [J]. 重庆医学, 2012, 41 (7) : 683-685.
- [36] 汤艳, 汪春梅, 何鸿雁, 等. 亚慢性十溴联苯醚对成年大鼠睾丸组织一氧化氮和一氧化氮合酶及标志酶的影响 [J]. 环境与健康杂志, 2016, 33 (2) : 109-111.
- [37] 金明华, 孙志伟, 石龙, 等. 甲基汞对小鼠睾丸细胞酶活性的影响 [J]. 中国公共卫生, 2001, 17 (9) : 789.
- [38] 叶琳, 任淑萍, 吕毅, 等. 甲醛对雄性小鼠睾丸中酶活力的影响 [J]. 环境与健康杂志, 2005, 22 (1) : 21-22.
- [39] 谢颖, 易义珍, 唐明德, 等. 甲醛对雄性小鼠生殖细胞的毒性 [J]. 环境与健康杂志, 2003, 20 (2) : 84-85.

(英文编辑 : 汪源 ; 编辑 : 陈姣 ; 校对 : 韩凤婵)