

镉诱导小鼠原代神经细胞程序性坏死的机制

何邵波, 蒋传命

邵阳学院医学检验学院, 湖南 邵阳 422000

摘要:

[背景] 镉是一种常见的重金属污染物, 以往的研究主要聚焦其影响细胞自噬和凋亡, 但其是否导致细胞程序性坏死尚不明确。

[目的] 研究镉诱导小鼠原代神经细胞程序性坏死的机制。

[方法] 以小鼠原代神经细胞为实验对象, $10\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化镉分别处理细胞 2、4、6、12、24、48 h, 用台盼蓝染色法计算细胞存活率; 采用流式细胞仪检测经 $10\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化镉处理后细胞周期的变化 (24、48 h) 及细胞程序性坏死水平 (48 h); 实时荧光定量 PCR 法检测经 $10\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化镉处理 48 h 后细胞程序性坏死相关基因如受体相互作用丝氨酸苏氨酸激酶 3 (*RIPK3*)、混合系列蛋白激酶样结构域蛋白 (*MLKL*) 的表达; 蛋白印迹法检测 5、10、 $20\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 镉离子处理后自噬相关蛋白 p62 的蛋白表达水平; 检测 p62 和自噬微管相关蛋白 1 轻链 3-B (LC3-B) 的荧光强度。

[结果] 小鼠原代神经细胞经 $10\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化镉处理 4、6、12、24、48 h 后细胞活力下降 ($P<0.05$); 相比较对照组 (49.62%), 细胞经 $10\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化镉处理 24 h 和 48 h 后分别有 60.88% 和 82.94% 的细胞停留在 G0—G1 期; $10\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化镉处理 48 h 后, 细胞程序性坏死水平 (47.50%) 高于对照组 (0.01%), 且细胞程序性坏死相关基因 *RIPK3* 和 *MLKL* 转录水平是对照组的 6.9 倍、3.7 倍。经 5、10、 $20\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化镉处理后小鼠原代神经元细胞自噬相关蛋白 p62 表达分别上调 (587±17) %、(609±14) %、(893±16) %。经 $10\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化镉处理后细胞内自噬相关蛋白 p62 和 LC3-B 在细胞内共定位, 且荧光强度高于对照组。

[结论] 镉离子能降低小鼠原代神经元细胞存活率, 使细胞周期停滞在 G0—G1 期且提高细胞程序性坏死水平, 可能与 p62 和 LC3-B 表达水平升高阻断细胞自噬流有关。

关键词: 镉; 小鼠原代神经细胞; 自噬; 细胞程序性坏死

Mechanism of cadmium-induced necroptosis of mouse primary nerve cells HE Shaobo, JIANG Chuanming (Department of Laboratory Medicine, Shaoyang University, Shaoyang, Hunan 422000, China)

Abstract:

[Background] Cadmium is a common heavy metal pollutant. Previous studies mainly focus on cadmium-induced autophagy and apoptosis, but whether it leads to cell necroptosis remains unclear.

[Objective] This study investigates the mechanism of cadmium-induced necroptosis of mouse primary nerve cells.

[Methods] Mouse primary neurons were treated with $10\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ cadmium chloride for 2, 4, 6, 12, 24, and 48 h, respectively. The cell survival rate was calculated by Trypan blue staining. The changes of cell cycle (24 and 48 h) and the rate of cell necroptosis (48 h) after treatment with $10\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ cadmium chloride were detected by flow cytometry. The expressions of genes related to cell necroptosis such as receptor interacting serine threonine kinase 3 (*RIPK3*) and mixed lineage kinase domain-like protein (*MLKL*) after being treated with $10\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ cadmium chloride for 48 h were measured by real-time fluorescence quantitative PCR. The protein expression of autophagy-related factor p62 and the fluorescence intensities of p62 and microtubule-associated protein 1 light 3-B (LC3-B) after $10\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ cadmium chloride treatment were analyzed by Western blotting and fluorescence observation.

[Results] The cell viability of mouse primary nerve cells were decreased after 4, 6, 12, 24, and 48 h treatment with $10\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ cadmium chloride ($P<0.05$). Compared with the control group

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2021.20453

作者简介

何邵波 (1983—), 男, 硕士, 讲师, 主管检验师;
E-mail: heshabo-001@163.com

通信作者

何邵波, E-mail: heshabo-001@163.com

伦理审批 已获取

利益冲突 无申报

收稿日期 2020-09-27

录用日期 2021-03-17

文章编号 2095-9982(2021)05-0536-06

中图分类号 R114

文献标志码 A

引用

何邵波, 蒋传命. 镉诱导小鼠原代神经细胞程序性坏死的机制 [J]. 环境与职业医学, 2021, 38 (5): 536-541.

本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2021.20453

Correspondence to

HE Shaobo, E-mail: heshabo-001@163.com

Ethics approval Obtained

Competing interests None declared

Received 2020-09-27

Accepted 2021-03-17

To cite

HE Shaobo, JIANG Chuanming. Mechanism of cadmium-induced necroptosis of mouse primary nerve cells[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2021, 38(5): 536-541.

Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2021.20453

(49.62%), 60.88% and 82.94% of cells were arrested in the G0-G1 phase after treatment with $10\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ cadmium chloride for 24 h and 48 h, respectively. The flow cytometry results showed that when being treated with $10\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ cadmium chloride for 48 h, the rate of cell necroptosis was higher (47.5%) than that of the control group (0.01%), and the transcription of cell necroptosis related genes such as *RIPK3* and *MLKL* were 6.9 and 3.7 times of the control group. The results of Western blotting showed that the expression of autophagy-related protein p62 in mouse primary neurons were upregulated by (587 $\pm$ 17) %, (609 $\pm$ 14) %, and (893 $\pm$ 16) % when being treated with 5, 10, and $20\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ cadmium chloride respectively. Further fluorescence observation showed that p62 and LC3-B were colocalized and the fluorescence intensity levels of them were increased after cadmium treatment.

[Conclusion] Cadmium treatment could reduce the survival rate of mouse primary neurons, arrest the cell cycle in G0-G1 phase, and increase the necroptosis rate. The mechanism by which cadmium induce necroptosis may be related to the increased expressions of p62 and LC3-B and then the blocked autophagy flow.

Keywords: cadmium; mouse primary neuron; autophagy; cell necroptosis

镉作为常见的具有高毒性的重金属污染物,通常以二价化合物的形式存在于水体和土壤中^[1]。镉目前已被国际癌症研究机构列为强致癌物质,由于其分布广、半衰期长以及易摄取等特点,容易在动物体内积累,从而导致慢性中毒,如肾中毒^[2]。长时间镉暴露也可引起器官纤维化或衰竭^[3],甚至癌症^[4]。镉导致上述疾病的机制可能与细胞所受的外界刺激密切相关:当刺激较大时,细胞死亡途径被激活从而介导细胞死亡;而当刺激不足以导致细胞死亡时,细胞可能失控而出现恶性转化^[5]。镉暴露导致的细胞死亡可分为细胞凋亡和细胞坏死,现阶段关于凋亡的研究较多,主要有凋亡样、Caspase 依赖或非依赖的细胞凋亡途径。

细胞坏死包括程序性坏死和非程序性坏死^[6]。其中,细胞程序性坏死通常与活性氧(reactive oxygen species, ROS)导致的膜脂过氧化,ATP产生不足导致的质膜离子泵功能紊乱,以及有毒物质的直接化学攻击有关^[6]。以往的研究大多关注镉诱导细胞凋亡的机制,而其导致细胞程序性坏死的机制目前仅有少量报道。研究表明肠外急性镉暴露可导致大鼠睾丸和非人灵长类动物睾丸出血坏死,而急性口服镉溶液则可引起胃和肠黏膜坏死^[7]。同时也有研究报道,浓度大于 $50\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的氯化镉会引起肾细胞坏死,而低浓度镉会引起细胞凋亡^[8]。最新的研究也显示重金属镉诱导的氧化应激通过调控淋巴细胞的miR-216a-PI3K/AKT信号途径促进细胞凋亡和坏死^[9]。此外,关于骨肉瘤的一项异种移植研究发现,镉诱导骨肉瘤坏死并降低骨肉瘤残余细胞的存活能力^[10]。

细胞程序性坏死并不是一个孤立的生物学过程,细胞自噬在细胞程序性坏死过程中发挥作用。自噬的发生及发展受到精密调控,从自噬相关基因1 (autophagy related gene 1, *Atg1*) 发现以来,在酵母

以及哺乳动物中相继鉴定出了一系列自噬相关基因^[11],其中自噬相关基因8 (autophagy related gene 8, *Atg8*) [哺乳动物中为自噬微管相关蛋白1轻链3 (microtubule-associated protein 1 light 3, LC3), 包括LC3A~C], 由于其能结合到自噬体膜的脂质分子上,其活化形式可以作为自噬发生的标志之一^[12]。相反,若细胞或组织中自噬降解底物p62蛋白积累或阳性,则说明自噬流被阻断^[13]。在神经细胞中有研究表明细胞自噬和细胞凋亡可以共同调控细胞死亡^[14]。

为探究镉诱导细胞程序性坏死的机制,本研究将以小鼠原代神经细胞为材料,首先用氯化镉处理细胞计算其存活率,然后用流式细胞仪分别检测其细胞周期和细胞程序性坏死相关基因[受体相互作用丝氨酸苏氨酸激酶3 (receptor interacting serine threonine kinase 3, *RIPK3*) 和混合系列蛋白激酶样结构域蛋白 (mixed lineage kinase domain-like, *MLKL*)] 转录水平,最后检测自噬相关蛋白p62的蛋白表达水平以及p62和LC3-B蛋白的荧光积累量,探讨镉诱导细胞程序性坏死是否依赖细胞自噬途径。

1 材料与方法

1.1 主要材料与仪器

DMEM培养基 (Sigma, 美国), Neurobasal™ Media (Gibco, 美国), HBSS培养基 (Gibco, 美国), Trypsin (Sigma, 美国), 胎牛血清 (Gibco, 美国), p62抗体 (Sigma, 美国), GAPDH抗体 (TransGen Biotech, 中国), 羊抗鼠IgG-HRP抗体 (TransGen Biotech, 中国), GFP-LC3-B腺病毒、mCherry-p62腺病毒 (Beyotime, 中国), 氯化镉 (国药, 中国), 多聚甲醛 (国药, 中国), 碘化丙啶 (propidium iodide, PI)、台盼蓝、天冬氨酸蛋白酶抑制试剂Pepstatin A、丝氨酸和半胱氨酸蛋白酶抑制剂Leupeptin (Sigma,

美国), RNase A、HEPES、PBS、NaCl、Glycerol、PMSF、Triton-X (上海生工, 中国), WB 增强型化学发光试剂 (Vazyme, 中国), RNA 提取以及实时荧光定量试剂盒 (上海生工, 中国), BCA 试剂盒 (Beyotime, 中国), Annexin V-FITC/PI 双染试剂盒 (BestBio, 中国)。

-80℃超低温冰箱 (Thermo, 美国), 7500 型实时荧光定量 PCR 仪 (ABI, 美国), IX73 型倒置显微镜 (Olympus, 日本), H2050R 高速冷冻离心机 (湘仪, 中国), 二氧化碳培养箱 (Salvis, 瑞士), 全波长酶标仪 (Molecular devices, 美国), BD LSR Fortessa 流式细胞仪 (BD, 美国)。

1.2 原代小鼠神经元的分离和培养

取妊娠 10~12 d 的 ICR 小鼠 (25~30 g) 脱臼处死, 用 75% 的乙醇浸泡 15 min, 在生物安全柜中取出小鼠子宫, 放置于 4℃预冷的 HBSS 中备用。然后迅速取出胎鼠再在解剖镜下剥离大脑皮质置于培养皿中。将上述组织剪碎后转移至离心管中, 用体积分数 0.01% 的胰酶消化至组织块逐渐消失。取等量的含 10% FBS 的 DMEM 轻轻吹打终止消化, 100×g 离心 5 min, 弃上清, 用 1 mL Neurobasal™ Media 重悬细胞并计数。取 1×10^6 个细胞接种于经 $10 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 多聚赖氨酸包被过的 6 孔板中培养, 体积 2 mL。每 48 h 进行培养基半量换液, 经 3 次换液后即可用于后续实验^[15]。本实验已通过邵阳学院实验动物伦理委员会审批 (无编号)。

1.3 台盼蓝染色检测细胞存活率

取 1×10^6 个小鼠原代神经元细胞接种到含 2 mL 培养液的 12 孔板中 (经 $10 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 多聚赖氨酸包被), 培养 2 d 后用 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化镉 (用超纯水配制) 处理 2、4、6、12、24、48 h, 用台盼蓝染色法计算细胞存活率。实验组和对照组各设 6 个重复孔。

1.4 流式细胞分析细胞周期和细胞程序性坏死

取 1×10^6 个小鼠原代神经元细胞培养 24 h 后, 分别用 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化镉处理 24、48 h。胰酶消化并离心收集细胞, 弃上清, 用预冷 PBS 洗细胞两次, 加入预冷 70% 乙醇固定。然后离心去上清并用 1 mL 的 PBS 洗一次, 加入 500 μL PBS (含 $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ PI、 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ RNase A), 4℃避光处理 30 min 后用流式细胞仪检测细胞周期。

通过 Annexin V-FITC/PI 双染试剂盒检测细胞程序性坏死水平, 将 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化镉处理 48 h, 细胞消化重悬后, 1×PBS 清洗 3 次, 然后 200 μL 的 1×PBS 重悬, 依次加入 Annexin V-FITC 及 PI 染色液, 室温孵育 30 min

后用流式细胞仪检测细胞程序性坏死状况。

1.5 实时荧光定量 PCR 法检测细胞程序性坏死相关基因

参照试剂盒 (上海生工) 的说明书进行了 RNA 提取以及实时荧光定量。引物序列如下, *Actin* 正向引物: 5'-CAACGAGCGGTTCCGATG-3', *Actin* 反向引物: 5'-GCCACAGGATTCCATACCCA-3'; *RIPK3* 正向引物: 5'-GAAGACACGGCACTCCTTGTA-3', *RIPK3* 反向引物: 5'-GGTGGTTCTTGA TG ACGGAGTTC-3'; *MLKL* 正向引物: 5'-CTGAGGGAAGTCTGGATAGAG-3', *MLKL* 反向引物: 5'-TAGTCGTCGAGGTCAAAGGAGC-3'。基因反转录和扩增程序如下: 50℃反转录 5 min, 95℃预变性 3 min, 95℃变性 10 s, 60℃退火、延伸, 采集荧光信号 30 s, 共扩增 40 个循环。

1.6 自噬相关蛋白 p62 和 LC3-B 蛋白检测

1.6.1 蛋白免疫印迹法检测 p62 蛋白含量 原代神经元细胞培养 24 h 后, 分别用 5、10、20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化镉处理 24 h 后用离心管收集细胞, 预冷 PBS 冲洗两次, 加入 1 mL 预冷的裂解缓冲液 [含 50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ HEPES (pH=7.4)、137 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl、10% Glycerol、1% TritonX-100、Pepstatin A ($1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、Leupeptin ($1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、PMSF ($1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)] 置于冰上, 超声裂解 10 s, 冰浴 10 min。13 000×g, 4℃离心 10 min, 取上清, 用 BCA 试剂盒 (碧云天) 测定蛋白浓度^[16]。一抗 p62、GAPDH 按照 1:3 000 的比例用 PBST 进行稀释, 4℃孵育过夜。经 PBST 漂洗后, 二抗羊抗鼠 IgG-HRP 以 1:4 000 进行稀释, 室温孵育 2 h, 用 PBST 漂洗后进行检测。

1.6.2 显微荧光观察法检测 p62 和 LC3-B 蛋白积累水平

将 5×10^6 个小鼠原代神经元细胞接种到含 2 mL 培养基的 6 孔板 (已用多聚赖氨酸包被) 上培养 1 d, 然后用 GFP-LC3-B、mCherry-p62 腺病毒感染细胞 24 h, 用于标记 LC3-B、p62 (荧光显微镜下分别显示为绿色荧光、红色荧光)。用 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化镉处理上述细胞, 每个处理组设 6 个平行重复, 处理完毕后将所含有的细胞的盖玻片用 PBS 漂洗 3 次, 用 4% 多聚甲醛于室温固定 45 min, PBS 漂洗 3 次, 封片, 于荧光显微镜下成像拍照^[17]。饥饿细胞 (即营养匮乏, 用 HBSS 培养基代替 DMEM 培养基) 作为阳性对照。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析, 数据以均值±标准差表示。多组间比较采用单因素方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 镉离子导致原代小鼠神经元细胞活力降低

如图1所示,经台盼蓝染色以及统计分析发现,用镉离子处理4h后,实验组较对照组细胞存活率明显下降 ($P<0.05$)。

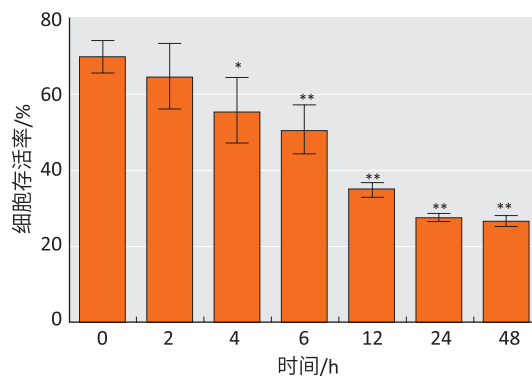
2.2 镉离子导致细胞周期停滞 G0 期

如图2所示:对照组49.62%细胞停留在G0—G1期,10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 镉离子处理24h组60.88%细胞停留在G0—G1期,处理48h组82.94%细胞停留在G0—G1期。

2.3 镉离子处理导致神经元细胞程序性坏死

相对于对照组而言,经10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 镉离子处理48h后,细胞出现PI单染阳性的水平明显提高(47.50%) (图3A、3B)。进一步荧光定量PCR结果显示,经镉离子处理后,细胞程序性坏死相关基因 *RIPK3* 以及 *MLKL*

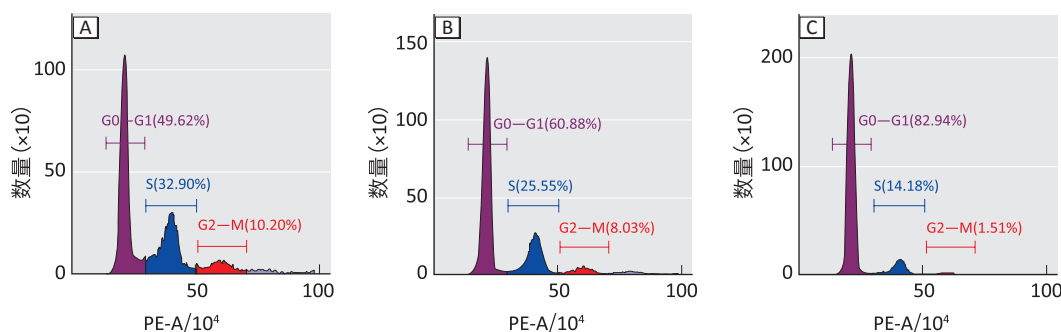
的mRNA水平是对照组的6.9倍和3.7倍(图3C)。



[注] *: $P<0.05$; **: $P<0.01$ 。

图1 不同染毒时间10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化镉处理组小鼠原代神经元细胞存活率 ($n=6$)

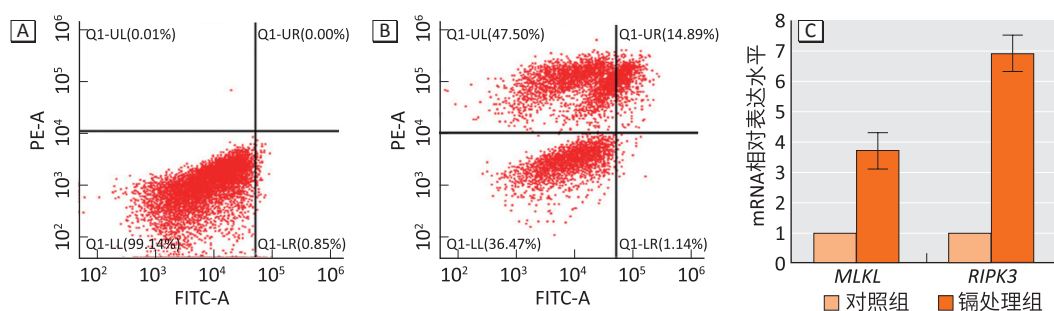
Figure 1 Survival rate of mouse primary neurons treated with 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CdCl_2 for different exposure time ($n=6$)



[注] A~C: 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 镉离子处理0、24、48h。

图2 镉离子处理后小鼠原代神经元细胞周期检测结果

Figure 2 Cell cycle of mouse primary neurons after treatment with cadmium ions



[注] A、B: 对照组和10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 镉离子处理48h后的小鼠原代神经元细胞程序性坏死水平(流式细胞图); C: 荧光定量PCR检测细胞程序性坏死相关基因mRNA水平。

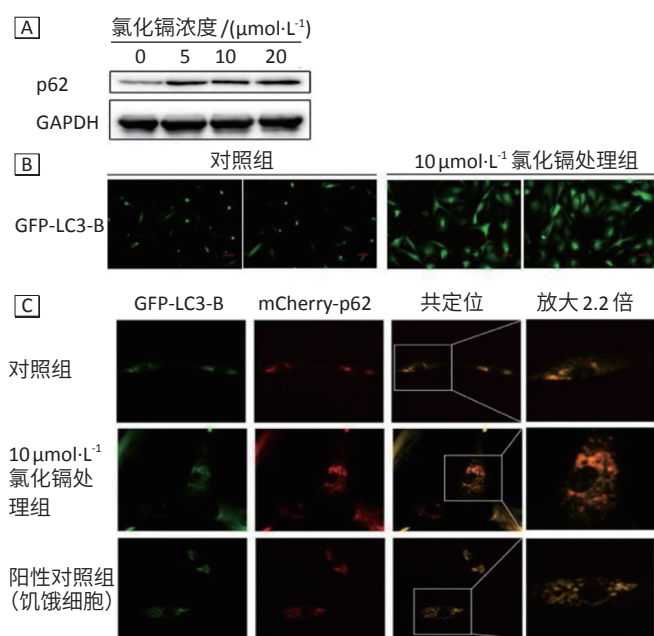
图3 小鼠原代神经元经镉离子处理48h后细胞程序性坏死水平

Figure 3 Cell necroptosis of mouse primary neurons after treatment with cadmium ions for 48h

2.4 镉离子处理导致神经元细胞自噬流阻断

蛋白免疫印迹结果发现(图4A),经5、10、20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化镉处理24h后小鼠原代神经元细胞自噬相关蛋白p62表达分别上调(587 $\pm$ 17)%、(609 $\pm$ 14)%、(893 $\pm$ 16)%。进一步,荧光检测细胞自噬流的关键指标

LC3-B发现,与对照组相比,经10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化镉处理后GFP-LC3-B斑点数量明显增多,荧光强度提高约3.24倍(图4B)。GFP-LC3-B和mCherry-p62荧光位置能完全叠加,镉离子处理组GFP-LC3-B和mCherry-p62荧光斑点数量和亮度高于对照组、阳性对照组(图4C)。



[注] A: p62 蛋白表达水平; B: 荧光检测 LC3-B 积累水平, 绿色荧光表示 LC3-B; C: LC3-B 和 p62 共定位检测结果, 红色荧光表示 p62 蛋白。

图4 镉离子染毒后小鼠原代神经元自噬相关蛋白表达

Figure 4 Expressions of autophagy-related proteins in mouse primary neurons after treatment with cadmium ions

3 讨论

镉离子污染引起的人群健康风险近年来越来越受到学者们的重视^[18], 其不仅可以影响基因表达, 抑制 DNA 损失修复, 也可导致细胞凋亡、坏死以及氧化应激反应等^[19]。然而, 镉引起神经细胞程序性坏死的具体机制仍有待深入研究。本研究发现镉离子可通过抑制小鼠原代神经细胞的自噬流进而引起细胞程序性坏死。当小鼠原代神经细胞经 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 镉离子处理后, 细胞活性在 4 h 后开始降低, 且处理时间越长, 细胞活力降低越明显 (图 1)。本研究推测细胞活力降低的原因主要有二: 其一, 细胞周期检测结果显示, $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 镉离子处理 24 h 或 48 h 分别有 60.88% 或 82.94% 停留在 G0—G1 期, 无法进入 S 期 (图 2); 其二, 细胞程序性坏死检测结果显示, 经镉离子处理的细胞, 其细胞程序性坏死率可达 47.50% (图 3), 证实镉离子能导致神经细胞损伤, 降低细胞活力。

目前, 对细胞程序性坏死机制的研究主要集中在肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 介导的通路^[20]。TNF 首先与其受体肿瘤坏死因子受体 1 (tumor necrosis factor receptor 1, TNFR1) 结合, 然后招募 RIPK1、肿瘤坏死因子受体相关因子 2 (TNF receptor-associated factor 2, TRAF2)、凋亡抑制蛋白 1/2 (cellular

inhibitor of apoptosis protein-1/2, cIAP1/2) 以及线性泛素链组装复合物 (linear ubiquitin chain assembly complex, LUBAC) 等蛋白形成复合物 I, 其解聚可进一步形成复合物 II-a、II-b 和 II-c, 前两者与细胞凋亡相关, 而 II-c 又称坏死体, 则与细胞程序性坏死有关^[21]。细胞程序性坏死的过程依赖激酶 RIPK1、RIPK3 以及 MLKL 的表达^[22]。本研究发现镉离子处理神经元细胞后, 细胞出现了大量的碎片化, 其细胞程序性坏死率可达 47.50%, 同时, 经镉离子处理后 RIPK3 以及 MLKL 转录水平也明显上升 (图 3B), 说明镉暴露确实导致了细胞程序性坏死。此研究为明确镉离子引起神经元细胞程序性坏死提供了较直接的依据。

另外, 本研究证明了镉离子引起小鼠原代神经细胞程序性坏死的机制与细胞自噬密切相关。当用镉离子处理小鼠原代神经细胞后, p62 蛋白表达水平明显上升, 同时通过荧光观察发现 GFP-LC3-B 和 mCherry-p62 斑点的数量也明显增多 (图 4)。p62 以及 GFP-LC3-B 常被作为自噬流的检测指标, 细胞内 p62 表达上升以及 GFP-LC3-B 数量增多, 通常提示自噬流受阻。因此, 本研究结果说明镉离子诱导的神经细胞程序性坏死与自噬流阻滞有关。

综上, 本研究结果表明镉离子可通过诱导小鼠神经细胞自噬流阻滞进而促进细胞程序性坏死。但镉离子经细胞自噬依赖途径诱导细胞死亡过程中的分子机制尚未完全明确, 仍需进一步探究。

参考文献

- [1] TURNER A. Cadmium pigments in consumer products and their health risks [J]. *Sci Total Environ*, 2019, 657: 1409-1418.
- [2] JÄRUP L, ÅKESSON A. Current status of cadmium as an environmental health problem [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2009, 238 (3): 201-208.
- [3] FERRARO PM, COSTANZI S, NATICCHIA A, et al. Low level exposure to cadmium increases the risk of chronic kidney disease: analysis of the NHANES 1999-2006 [J]. *BMC Public Health*, 2010, 10: 304.
- [4] HARTWIG A. Cadmium and cancer [M] // SIGEL A, SIGEL H, SIGEL R K. *Cadmium: from Toxicity to Essentiality*. Dordrecht: Springer, 2013: 491-507.
- [5] THÉVENOD F, LEE W K. Cadmium and cellular signaling cascades: interactions between cell death and survival pathways [J]. *Arch Toxicol*, 2013, 87 (10): 1743-1786.

- [6] VANDEN BT, LINKERMANN A, JOUAN-LANHOUE S, et al. Regulated necrosis : the expanding network of non-apoptotic cell death pathways [J] . NatRev Mol Cell Biol, 2014 (15) : 135-147.
- [7] World Health Organization. IPCS environmental health criteria 134 : cadmium [R] . Geneva : World Health Organization, 1992.
- [8] LEE WK, THÉVENOD F. Novel roles for ceramides, calpains and caspases in kidney proximal tubule cell apoptosis : lessons from *in vitro* cadmium toxicity studies [J] . Biochem Pharmacol, 2008, 76 (11) : 1323-1332.
- [9] ZHANG J, ZHENG S, WANG S, et al. Cadmium-induced oxidative stress promotes apoptosis and necrosis through the regulation of the miR-216a-PI3K/AKT axis in common carp lymphocytes and antagonized by selenium [J] . Chemosphere, 2020, 258 : 127341.
- [10] DEMIRKIRAN ND, AKTAŞ S, ERÇETIN AP, et al. Cadmium in bone cement induces necrosis and decreases the viability of residual osteosarcoma cells : a xenograft study [J] . Acta Orthop Traumatol Turc, 2020, 54 (4) : 445-452.
- [11] MIZUSHIMA N, Yoshimori T, Ohsumi Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation [J] . Annu Rev Cell Dev Biol, 2011, 27 : 107-132.
- [12] OTOMO C, METLAGEL Z, TAKAESU G, et al. Structure of the human ATG12~ATG5 conjugate required for LC3 lipidation in autophagy [J] . Nat Struct Mol Biol, 2013, 20 (1) : 59-66.
- [13] KOMATSU M, WAGURI S, KOIKE M, et al. Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice [J] . Cell, 2007, 131 (6) : 1149-1163.
- [14] CESCONE M, CHEN P, CASTAGNARO S, et al. Lack of collagen VI promotes neurodegeneration by impairing autophagy and inducing apoptosis during aging [J] . Aging (Albany NY), 2016, 8 (5) : 1083-1101.
- [15] XU C, ZHANG H, LIU C, et al. Rapamycin inhibits Erk1/2-mediated neuronal apoptosis caused by cadmium [J] . Oncotarget, 2015, 6 : 21452-21467.
- [16] LONG N, ORASCH T, ZHANG S, et al. The Zn₂Cys₆-type transcription factor LeuB cross-links regulation of leucine biosynthesis and iron acquisition in *Aspergillus fumigatus* [J] . PLoS Genet, 2018, 14 (10) : e1007762.
- [17] LIU C, ZHANG R, SUN C, et al. Resveratrol prevents cadmium activation of Erk1/2 and JNK pathways from neuronal cell death via protein phosphatases 2A and 5 [J] . J Neurochem, 2015, 135 (3) : 466-478.
- [18] RODRÍGUEZ-BARRANCO M, LACASAÑA M, AGUILAR-GARDUÑO C, et al. Association of arsenic, cadmium and manganese exposure with neurodevelopment and behavioural disorders in children : a systematic review and meta-analysis [J] . Sci Total Environ, 2013, 454-455 : 562-577.
- [19] 朱海美, 王淑颜, 常艳. 镉毒性分子机制及评价方法的研究进展 [J] . 环境与职业医学, 2020, 37 (11) : 1132-1139. ZHU HM, WANG SY, CHANG Y. Research progress on molecular mechanisms and evaluation methods of cadmium toxicity [J] . J Environ Occup Med, 2020, 37 (11) : 1132-1139.
- [20] SUN L, WANG X. A new kind of cell suicide : mechanisms and functions of programmed necrosis [J] . Trends Biochem Sci, 2014, 39 (12) : 587-593.
- [21] CONRAD M, ANGELI JPF, VANDENABEELE P, et al. Regulated necrosis : disease relevance and therapeutic opportunities [J] . Nat Rev Drug Discov, 2016, 15 (5) : 348-366.
- [22] GALLUZZI L, KEPP O, KRAUTWALD S, et al. Molecular mechanisms of regulated necrosis [J] . Semin Cell Dev Biol, 2014, 35 : 24-32.

(英文编辑：汪源；责任编辑：陈姣)