

KIF1A 过表达对氧糖剥夺-再灌注损伤 PC12 细胞的作用机制研究

徐汪洋, 张 辉, 黄丽珊, 林想红, 王业杨
(广东省第二人民医院骨科中心 515000 广州市)

【摘要】目的:研究 Kinesin-3 家族成员蛋白(Kinesin-3 family member1A, KIF1A)对氧糖剥夺-再灌注诱导的 PC12 细胞活力、自噬和凋亡的影响,为进一步研究 KIF1A 在脊髓缺血再灌注损伤治疗方面提供理论依据。**方法:**PC12 细胞(美国 ATCC 公司)分为四组:A 组,对照组,无处理;B 组,氧糖剥夺再灌注(oxygen glucose deprivation/reperfusion, OGD/R)组,PC12 细胞用无糖 DMEM 培养基,于含混合气体(95% N₂ 和 5% CO₂)的 37℃ 恒温箱内密闭缺氧培养 4h;C 组,pcDNA3.1 空质粒组,PC12 细胞转染 pcDNA3.1 空质粒 48h,进行 OGD/R 处理;D 组,pcDNA3.1-KIF1A 质粒组,PC12 细胞转染 pcDNA3.1-KIF1A 质粒 48h,进行 OGD/R 处理。B、C、D 组经 OGD/R 处理后,更换常规培养基,正常孵育 24h,收集细胞总 RNA 及蛋白质,进行实时定量 PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)和 Western blot 检测 KIF1A mRNA 和蛋白的表达情况;CCK8 检测细胞存活率变化;凋亡 ELISA 及 Caspase-3 活性检测试剂盒检测细胞凋亡及 Caspase-3 活性;Western blot 检测各组自噬相关基因 LC3-I、LC3-II、P62 以及哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号通路的蛋白表达变化。**结果:**与 A 组(1.00±0.00)相比, B 组细胞 KIF1A mRNA(0.41±0.05)和蛋白表达水平(0.52±0.07, $P<0.05$)显著下调;细胞活力[(51.60±7.35)%, $P<0.05$]显著降低。与 B 组(1.00±0.00)相比, C 组空质粒对 KIF1A mRNA(0.91±0.13)及蛋白质(1.08±0.08)表达,细胞活力[(51.60±7.35)% vs (47.30±4.16)%],细胞凋亡(1.95±0.18 vs 2.08±0.16, $P>0.05$)等无显著影响。而 D 组 KIF1A 过表达后能显著上调 KIF1A mRNA(2.63±0.16)以及蛋白表达(2.51±0.18, $P<0.05$),显著缓解 OGD/R 引起的细胞存活率下降[(51.60±7.35)% vs (86.40±9.03)%]及凋亡[1.95±0.18 vs 1.36±0.12, $P<0.05$];与 B 组相比, D 组自噬相关蛋白 LC3-II/LC3-I 的比值(1.68±0.14 vs 1.19±0.09, $P<0.05$)及 pmTOR 的表达(1.00±0.00 vs 1.26±0.02, $P<0.05$)显著受抑制, P62 表达显著升高(0.53±0.05 vs 0.89±0.09, $P<0.05$)。**结论:**KIF1A 过表达可促进缺血再灌注损伤诱导的 PC12 细胞存活、抑制细胞自噬与凋亡,其机制可能与抑制 mTOR 通路相关。

【关键词】 Kinesin-3 家族成员蛋白 1A; PC12 细胞; 氧糖剥夺; 凋亡; 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2020.04.12

中图分类号: Q256 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2020)-04-0365-07

The effects of KIF1A overexpression on oxygen-glucose deprivation and reperfusion induced PC12 cell injury/XU Wangyang, ZHANG Hui, HUANG Lishan, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2020, 30(4): 365-371

【Abstract】 Objectives: To investigate the effects of the Kinesin-3 family member, Kinesin-3 family member 1A (KIF1A) on cell survival, autophagy and cell apoptosis capacity of PC12 cells after oxygen-glucose deprivation and reperfusion, and to provide theoretical basis for further study of KIF1A in the treatment of spinal cord ischemia reperfusion injury. **Methods:** PC12 cells were divided into four groups as follows: group A, Control, no treatment; group B: oxygen glucose deprivation/reperfusion (OGD/R), PC12 cells were cultured in a glucose-free DMEM medium in a 37℃ incubator containing mixed gases (95% N₂ and 5% CO₂) for 4h;

基金项目:广东省自然科学基金(2018A0303130183);广东省第二人民医院院内青年基金(YQ2017-011);广东省第二人民医院博士工作站基金(2019BSGZ005)

第一作者简介:男(1981-),副主任医师,研究方向:脊柱骨科

电话:(020)89169608 E-mail:alimyrforever@163.com

通讯作者:王业杨 E-mail:yeyangw2@163.com

group C: cells were transfected with pcDNA3.1 plasmid for 48h and then underwent OGD/R; group D: cells were transfected with pcDNA3.1-KIF1A plasmid for 48h and then underwent OGD/R. For group B, C, D, after OGD/R, normal complete medium were changed for 24h incubation. Total RNA and proteins were isolated for quantitative real-time PCR (QRT-PCR) and Western blot analysis. CCK8 was used to observe cell viability. Cell death ELISA kit and Caspase-3 activity detection kit were used to detect apoptosis and caspase-3 activity. The expression levels of autophagy related proteins and mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling were investigated by Western blot. **Results:** Compared with group A (1.00 ± 0.00), OGD/R treatment (group B) could significantly decrease mRNA (0.41 ± 0.05) and protein expression levels (0.52 ± 0.07) of KIF1A in PC12 cells ($P < 0.05$) and inhibit cell viability [$(1.00 \pm 0.00)\%$ vs $(51.60 \pm 7.35)\%$; $P < 0.05$]. Compared with group B, pcDNA3.1 transfection in group C had no significant influence on KIF1A mRNA (0.91 ± 0.13) and protein expression (1.08 ± 0.08), cell viability [$(51.60 \pm 7.35)\%$ vs $(47.30 \pm 4.16)\%$] and apoptosis [1.95 ± 0.18 vs 2.08 ± 0.16 , $P > 0.05$]. However, compared with group B, KIF1A overexpression in group D significantly up-regulated KIF1A mRNA (2.63 ± 0.16) and protein (2.51 ± 0.18 , $P < 0.05$) expression levels, and promoted the survival rate [$(51.60 \pm 7.35)\%$ vs $(86.40 \pm 9.03)\%$, $P < 0.05$] and apoptosis (1.95 ± 0.18 vs 1.36 ± 0.12 , $P < 0.05$). KIF1A overexpression inhibited the ratio of autophagy-related protein LC3-II/LC3-I (1.68 ± 0.14 vs 1.19 ± 0.09 , $P < 0.05$) and expression of pmTOR (1.00 ± 0.00 vs 1.26 ± 0.02 , $P < 0.05$), and promoted P62 expression (0.53 ± 0.05 vs 0.89 ± 0.09 , $P < 0.05$). **Conclusions:** Overexpression of KIF1A in PC12 cells could significantly promote OGD/R induced cell survival and inhibited OGD/R induced autophagy and apoptosis. mTOR pathway may be involved in the protective mechanism of KIF1A.

【Key words】 Kinesin-3 family member 1A; PC12 cell; Oxygen-glucose deprivation and reperfusion; Apoptosis; Mammalian target of rapamycin

【Author's address】 Department of Orthopedic, Guangdong Second Provincial General Hospital, Guangzhou, 515000, China

脊髓损伤是由于外伤或者疾病诱发的脊柱损伤严重的并发症,是引起患者瘫痪或感觉障碍的主要原因,目前尚无特效疗法,近年来,该病引起了越来越多的关注^[1]。全世界每年脊髓损伤的发生率为 15~40 例/百万人口^[2],给患者家庭以及社会带来巨大的经济负担。脊髓受损以后,会导致神经细胞灰质区出血性坏死,造成神经细胞膜与结缔组织的剪切性损伤^[3]。有研究表明,缺血可以诱发继发性损伤,进一步引起脊髓功能障碍^[4]。脊髓手术引起的脊髓缺血再灌注损伤 (ischemia/reperfusion injury, I/R) 能够影响中枢神经系统 (central nervous system, CNS), 诱发神经退行性变,并且增加即刻或延迟截瘫的发生率^[5,6]。

肌动蛋白家族成员 1A (Kinesin-3 family member 1A, KIF1A) 是神经元特异性的驱动蛋白家族成员,是一种球状的单分子,在突触囊泡前体轴突转运方面发挥顺行运动活性^[7]。研究发现, KIF1A 能够调控自噬相关蛋白 (autophagy-related protein 9, ATG-9) 的表达,调节突触的神经发育和自噬。然而,有关 KIF1A 与脊髓缺血再灌注损伤的研究未见报道。本研究通过观察 KIF1A 在氧

糖剥夺-再灌注 (oxygen glucose deprivation/reperfusion, OGD/R) 诱导的 PC12 细胞中的表达情况,并且研究 KIF1A 过表达对 OGD/R 诱导的 PC12 细胞存活、自噬以及凋亡的影响,同时探讨其可能的分子机制,为 KIF1A 在脊髓损伤临床应用中的作用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

大鼠肾上腺髓质嗜铬瘤分化细胞株 PC12 细胞株 (美国 ATCC 公司); 青霉素、链霉素 (15140163)、DMEM 培养基 (11995-065)、胎牛血清 (10099-141)、胰蛋白酶 (25200-056) (美国 Gibco 公司); CCK-8 试剂盒 (C0037)、BCA 试剂盒 (P0012S)、RIPA 裂解液 (P0013C)、Caspase-3 活性检测试剂盒 (C1115) (碧云天公司); Trizol (15596-018, Invitrogen 公司); 反转录试剂盒 (RR037A, Takara 公司); 荧光定量 PCR 仪、酶标仪 (Bio-Rad 公司); 细胞凋亡检测 ELISA 试剂盒 (11774425001, Roche 公司); 兔抗鼠 KIF1A (ab180153)、LC3B (ab192890)、p62 (ab109012)、

β -actin (ab179467)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) (ab109268)、p-mTOR (phospho S2448, ab109268) 一抗抗体以及辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗抗体 (ab6940) (Abcam 公司); Lipofectamine-2000 (11668027), pcDNA3.1 (V795-20) (Invitrogen 公司)。序列合成及测序委托生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 pcDNA3.1-KIF1A 重组载体的构建 根据基因库 (Genebank) 中 KIF1A 基因序列 (GeneID: 547), 使用 DNASTAR 软件设计 PCR 特异性引物, 采用分段克隆后利用 PCR 拼接的方式获得 KIF1A 基因全长编码序列。分段克隆的引物为 P1: 上游引物, 5'-ACC CAA ATT GAC CAA TGC CC-3', 下游引物: 5'-GGG CAT TGG TCA ATT TGG GT-3' (2.93kb); P2, 上游引物, 5'-ATG CAC AAC TCT CTC CTG CT-3', 下游引物, 5'-GGC TCC TTG TCT GTC TCT GT-3' (2.50kb)。上下游引物分别引入限制性内切酶位点 Xmn I、BamH I 及保护碱基。KIF1A cDNA PCR 扩增体系为 10 μ l, 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 变性 5min; 94 $^{\circ}$ C 1min, 61 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 1.5min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min, 扩增目的片段。使用凝胶回收试剂盒对 PCR 产物进行电泳回收, 使用 Xmn I, BamH I 双酶切后与经相同酶切的 pcDNA3.1 载体进行连接 (16 $^{\circ}$ C, 1.5h)。连接产物转化大肠杆菌 *E.coli* DH5 α 感受态后, 挑取单菌落扩增后提取质粒, 测序确定重组质粒 pcDNA3.1-KIF1A 是否构建成功。

1.2.2 细胞培养与实验分组 PC12 细胞培养使用含 10% 胎牛血清, 5% 马血清, 1% 青霉素和链霉素的 DMEM 培养基于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 (图 1)。实验分组如下: A 组, 对照组, 细胞不进行任何处理; B 组, 氧糖剥夺再灌注 (oxygen glucose deprivation/reperfusion, OGD/R) 组, PC12 细胞培养于无糖 DMEM 培养基, 于含混合气体 (95% N₂ 和 5% CO₂) 的 37 $^{\circ}$ C 恒温箱内密闭缺氧 4h; C 组, pcDNA3.1 空质粒组, PC12 细胞转染 pcDNA3.1 空质粒 48h, 然后采用 OGD/R 处理; D 组, pcDNA3.1-KIF1A 质粒组, PC12 细胞转染 pcDNA3.1-KIF1A 质粒 48h, 然后采用 OGD/R 处理。B 组、C 组、D 组细胞 OGD/R 处理 4h 后, 更换

常规培养基, 转移至含 95% 空气和 5% CO₂ 培养箱内继续孵育 24h。然后收集细胞进行后续实验。对于 C 组与 D 组细胞, 使用 Lipofectamine-2000 转染试剂将对照空质粒或重组质粒转染至细胞。

1.2.3 CCK-8 法检测细胞存活 细胞存活率采用 CCK-8 法进行检测。PC12 细胞以 5 \times 10³ 个/孔的密度接种于 96 孔板中, 如上进行分组处理。每孔加入 20 μ l CCK-8 溶液, 继续培养 3h。采用酶标仪检测 450nm 各孔的吸光值 (OD450)。细胞活力 (%) = (实验组 - 空白组) / (对照组 - 空白组) \times 100%。空白组孔有培养基和 CCK 溶液而没有细胞。实验独立重复 3 次, 结果取平均值。

1.2.4 细胞凋亡实验 取对数生长期 PC12 细胞以 5 \times 10³ 个/孔的密度接种于 96 孔板中, 如上进行分组处理。采用细胞凋亡 ELISA 试剂盒根据试剂盒说明书进行 PC12 细胞凋亡的检测, 测定 405nm 处吸光度值 (OD405), 并与对照组比较, 计算实验组相对凋亡情况。实验独立重复 3 次, 结果取平均值。

1.2.5 Caspase-3 活性检测 PC12 细胞中 caspase-3 的活性采用 Caspase-3 活性检测试剂盒进行测定。取对数生长期 PC12 细胞以 5 \times 10³ 个/孔的密度接种于 96 孔板中, 如上进行分组处理。参照试剂盒说明书进行检测。

1.2.6 实时定量 PCR (quantitative real-time

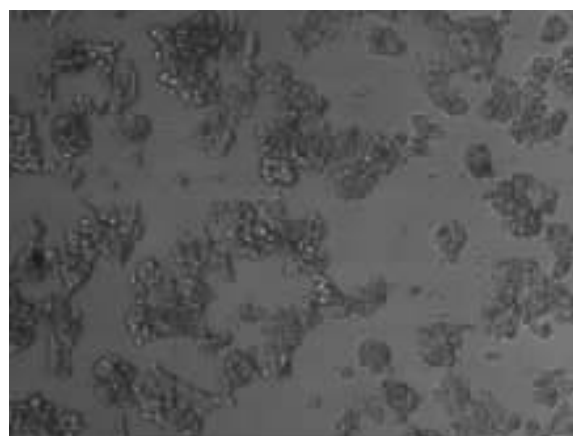


图 1 生长良好的 PC12 细胞分裂增殖并聚团生长, PC12 细胞呈圆形, 胞体周围有晕光。培养 5~10d 后, 增殖的 PC12 细胞形成密集细胞簇

Figure 1 The well-grown PC12 cells proliferate and cluster. The PC12 cells are round with halo light around the cells. After 5-10 days of culture, the proliferating PC12 cells formed dense cell clusters

PCR, qRT-PCR) 实验 取对数生长期 PC12 细胞以 5×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔板中, 分组处理同前。收集细胞, 采用 Trizol 试剂提取 RNA, 逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA。以 cDNA 为模板, 参照 SYBR Select Master Mix 试剂盒说明书进行 PCR 反应, 以 β -actin 为内参。反应条件为: 95°C 10min, 95°C 20s, 58°C 40s, 72°C 30s, 循环 40 次。实验所用引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法测定基因的表达。

1.2.7 Western blot 实验 取对数生长期 PC12 细胞以 5×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔板中, 分组处理同前。收集细胞, 用细胞裂解液 RIPA 于 4°C 下裂解细胞, 获取总蛋白, BCA 试剂盒检测蛋白浓度; 提取的蛋白在 10% SDS-PAGE 电泳中分离, 电转印法进行转膜, 脱脂奶粉封闭, 加入 KIF1A、LC3-I、LC3-II、p62、mTOR、p-mTOR、 β -actin 一抗孵育过夜; 然后加入辣根过氧化物标记的羊抗兔二抗室温孵育 4h。ECL 显色, 上机检测, β -actin 为内参。实验独立重复 3 次, 每次 3 个复孔, 结果取平均值。

1.3 统计学处理

本研究中所有数据均采用平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 进行表示。用 SPSS 18.0 统计软件进行统计分析。采用单因素方差分析进行多组间比较, 事后检验采用 LSD。两组之间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 OGD/R 处理对 PC12 细胞中 KIF1A 的表达的影响

qRT-PCR 检测结果显示, 与 A 组相比较, 采用 OGD/R 处理 PC12 细胞以后, B 组细胞中 KIF1A mRNA 表达明显降低 (表 1)。Western blotting 检测结果显示, 与 A 组相比较, OGD/R 处理显著抑制 B 组 PC12 细胞 KIF1A 蛋白的表达, 差异具有统计学意义 (图 2)。

2.2 KIF1A 过表达对 OGD/R 诱导的 PC12 细胞活性的影响

qRT-PCR 和 Western blotting 检测结果显示: 与 B 组相比较, KIF1A mRNA 以及蛋白表达水平在 D 组中显著升高, 差异具有显著性 (表 2, 图 3)。采用 CCK-8 法检测细胞活性, 与 A 相 [(100.00 \pm 0.00)%] 比较, B 组细胞活性显著下降

[(51.60 \pm 7.35)%, $P < 0.05$]; 与 B 组比较, C 组空白质粒转染组对细胞活性无明显影响 [(47.30 \pm 4.16)%], 而 D 组 KIF1A 过表达的 PC12 细胞活性显著上升 [(86.40 \pm 9.03)%, $P < 0.05$]。

2.3 KIF1A 过表达对 OGD/R 诱导的 PC12 细胞凋亡的影响

细胞凋亡 ELISA 检测试剂盒检测结果显示: 与 A 组相比较, B 组细胞凋亡明显上升。与 B 组相比较, D 组细胞转染 KIF1A 后凋亡显著降低。Caspase-3 活性检测试剂盒检测结果显示: 与 A 组相比较, B 组细胞 caspase-3 活性明显上升。与 B 组相比较, D 组细胞 caspase-3 活性显著降低 (表 3)。

2.4 KIF1A 过表达对 OGD/R 诱导的 PC12 细胞自噬的影响

Western blotting 检测结果显示: 与 A 组相比较, OGD/R 处理显著上调自噬相关蛋白 LC3-II/LC3-I 的比例, 并且抑制 P62 的蛋白表达。与 B 组相比较, LC3-II/LC3-I 的比例在 D 组中明显

表 1 PC12 细胞中 KIF1A mRNA 及蛋白质相对表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

	Table 1 Relative mRNA and protein expression levels of KIF1A in PC12 cells	
	A组 Group A	B组 Group B
信使核糖核酸 mRNA	1.00 \pm 0.00	0.41 \pm 0.05 ^①
蛋白质 Protein	1.00 \pm 0.00	0.52 \pm 0.07 ^①

注: ①与 A 组比较 $P < 0.05$

Note: ①Compared with group A, $P < 0.05$

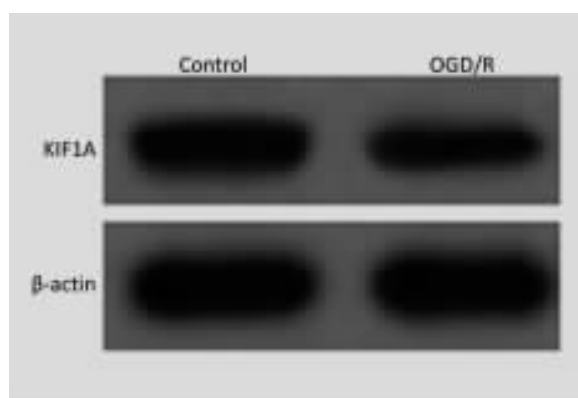


图 2 Western blotting 检测显示 OGD/R 处理显著抑制 PC12 细胞中 KIF1A 蛋白的表达

Figure 2 OGD/R treatment significantly inhibit the expression of KIF1A in PC12 cells by Western blotting

下降,而 P62 的蛋白表达显著上升(图 4)。与 B 组相比较,LC3-II/LC3-I 的比例以及 P62 的蛋白表达在 C 组中没有明显变化,差异不具有统计学意义(表 4)。

2.5 KIF1A 过表达对 mTOR 通路的影响

Western blotting 检测结果显示,与 A 组相比较,OGD/R 处理显著上调 pmTOR 蛋白的表达,与 B 相比较,D 组 KIF1A 过表达能显著抑制 pmTOR 的表达(图 5),而 C 组空质粒组中 pmTOR 的表达没有明显变化(表 4)。

3 讨论

脊髓损伤是一种严重致残、致死的疾病,包括原发损伤和继发性损伤,临床治疗较为复杂,目前尚无有效的治疗方法^[8,9]。急性脊髓损伤后继发多种病理生化改变,导致脊髓进一步继发性损伤。继发性损伤一般发生在原发性损伤的数小时、数天或者数周内,包括创伤后氧化应激反应、炎症反

应、活性氧和过氧化氢的过量产生、局部组织微循环缺血缺氧、神经元凋亡和坏死等^[8,9]。脊髓损伤后发生的缺血性再灌注损伤,诱发细胞内的黄嘌呤脱氢酶转变为黄嘌呤氧化酶,抑制蛋白水解,提高细胞内的氧含量和自由基的含量,影响细胞凋亡,加重脊髓的损伤程度^[3]。本研究采用 OGD/R 诱导的 PC12 细胞体外模拟脊髓缺血再灌注损伤,模拟脊髓损伤发生时神经元的变化,研究 KIF1A 在脊髓缺血再灌注损伤中的作用以及相关机制。

缺血再灌注后,体外培养的 PC12 细胞增殖能力减弱,细胞凋亡率增加,且自噬相关蛋白的表达显著上调。同时我们发现 OGD/R 损伤的 PC12 细胞中 KIF1A 基因以及蛋白的表达显著降低,提示 KIF1A 可能在缺血再灌注损伤中有一定的保护作用。通过进一步构建 KIF1A 过表达的 PC12 细胞,发现 KIF1A 过表达促进 OGD/R 诱导的 PC12 细胞存活,抑制细胞凋亡以及 caspase-3 活性,证实 KIF1A 对缺血再灌注诱导的神经元损伤

表 2 转染 pcDNA3.1 空质粒及 pcDNA3.1-KIF1A 质粒的 PC12 细胞中 KIF1A 水平变化 ($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Relative levels of KIF1A in pcDNA3.1 and pcDNA3.1-KIF1A transfected PC12 cells

	B组 Group B	C组 Group C	D组 Group D
信使核糖核酸 mRNA	1.00±0.00	0.91±0.13	2.63±0.16 ^①
蛋白质 Protein	1.00±0.00	1.08±0.08	2.51±0.18 ^①

注:①与 B 组及 C 组比较 $P<0.05$

Note: ①Compared with group B and group C, $P<0.05$

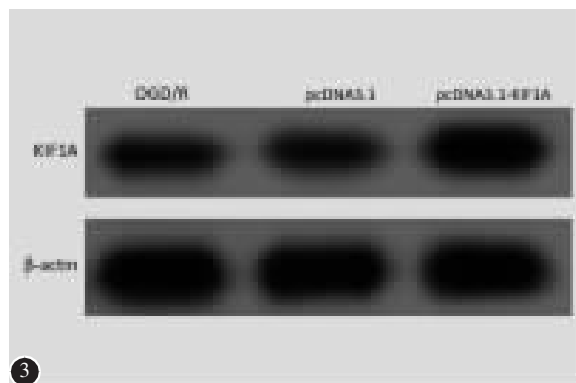


图 3 KIF1A 过表达的 PC12 细胞中 KIF1A 蛋白表达与 OGD/R 组相比显著升高

Figure 3 The expression of KIF1A in KIF1A overexpressed PC12 cell was significantly increased compared with OGD/R group

表 3 PC12 细胞的凋亡及 caspase 3 表达情况 ($\bar{x}\pm s$)
Table 3 Cell apoptosis and the expression of caspase 3 of PC12 cells

	A组 Group A	B组 Group B	C组 Group C	D组 Group D
细胞凋亡 Cell apoptosis	1.00±0.00	1.95±0.18 ^①	2.08±0.16	1.36±0.12 ^②
Caspase 3	1.00±0.00	2.25±0.19 ^①	2.13±0.15	1.47±0.11 ^②

注:①与 A 组比较 $P<0.05$;②与 B 组比较 $P<0.05$

Note: ①Compared with group A, $P<0.05$; ②Compared with group B, $P<0.05$

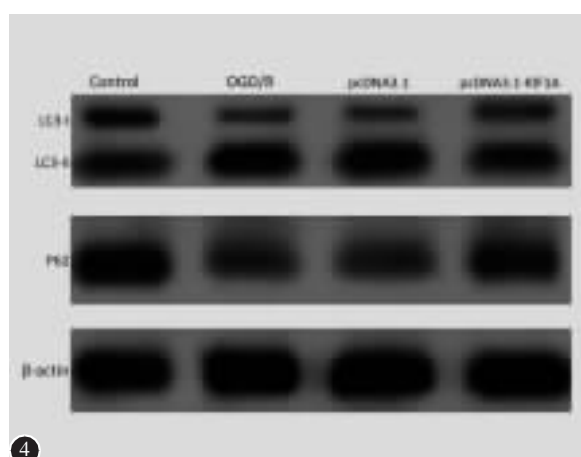


图 4 KIF1A 过表达显著抑制 OGD/R 诱导的 PC12 细胞自噬

Figure 4 KIF1A overexpression significantly suppressed OGD/R induced PC12 cell autophagy

的保护作用。KIF1A 位于 2 号染色体的长臂上 (2q37.3), 是神经元特异性的激酶-3 家族运动蛋白质成员之一, KIF1A 是一种球状的单体分子, 能够以 $1.2\mu\text{m/s}$ 的速度在突触囊泡前体轴突转运中进行顺行运动^[7]。KIF1A 能够沿着微管轨道将物质固定在神经元的细胞体上, 沿着微管轨道将物质运输到突触, 然后释放该物质^[10]。已有研究证实, KIF1A 能够将包含 netrin-1 分子的囊泡从神经元胞体运输至轴突, 参与突触分泌 netrin-1 分子的过程^[11]。研究证实, Netrin-1 和肌动蛋白 KIF1A 对实验性脑出血后继发性脑损伤有保护作用^[12]。Stavoe 等证实 KIF1A 介导 ATG-9 的运输, 调节神经发育和突触自噬^[13]。研究证明, 运动蛋白 KIF1A 能够介导神经营养因子受体 TrkA 的转运, 在感觉神经元的存活和功能维持中发挥至关重要的作用^[14]。本研究证实, KIF1A 在 OGD/R 诱导的 PC12

细胞损伤中发挥神经保护作用, 能够促进细胞存活, 抑制自噬以及凋亡。

本研究中我们还对 KIF1A 在缺血再灌注损伤中的保护作用机制进行了探讨。相比 OGD/R 诱导的 PC12 细胞, KIF1A 过表达的 PC12 细胞中自噬相关蛋白 LC3-II/LC3-I 的比例显著下调, 且 P62 蛋白的表达显著上调, 说明细胞自噬可能参与 KIF1A 的保护机制。自噬是一个细胞降解过程, 对神经元的发育和存活非常重要^[13]。mTOR 靶蛋白是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 在多种细胞生理过程中发挥重要作用, 包括细胞周期、细胞生长、细胞存活以及细胞自噬^[15]。研究证实, mTOR 通路介导百草枯诱导的 PC12 细胞自噬^[16]。mTOR 通路参与神经生长因子对酒精诱导的 PC12 细胞的保护作用^[17]。Park 等研究显示, 抑制 mTOR 通路的激活抑制溴氰菊酯诱导的 PC12 细胞凋亡^[18]。本研究中我们发现, mTOR 通路在 OGD/R 诱导的 PC12 细胞中被磷酸化激活, 而 KIF1A 过表达则抑制 OGD/R 诱导的 mTOR 磷酸化, 提示 KIF1A 可能通过抑制 mTOR 通路磷酸化激活抑制细胞自噬, 发挥保护作用。

综上所述, 本研究发现 OGD/R 处理 PC12 细胞, 抑制 KIF1A 的表达。KIF1A 过表达促进 OGD/R 诱导的 PC12 细胞存活, 抑制细胞自噬以及凋亡。此外, 本文证实, KIF1A 调控 OGD/R 诱导的 PC12 细胞存活, 抑制细胞自噬以及凋亡可能与 mTOR 通路相关。通过对 KIF1A 与 PC12 细胞缺血再灌注损伤的研究, 为进一步研究该分子在脊髓损伤中的作用提供理论基础以及新靶点。

表 4 不同组 PC12 细胞中 LC3-II/LC3-I、P62 及 mTOR 蛋白相对表达情况 ($\bar{x}\pm s$)

Table 4 Relative protein expression of LC3-II/LC3-I, P62 and mTOR in different groups of PC12 cells

	A组 Group A	B组 Group B	C组 Group C	D组 Group D
LC3-II/ LC3-I	1.00±0.00	1.68±0.14 ^①	1.77±0.16	1.19±0.09 ^②
P62	1.00±0.00	0.53±0.05 ^①	0.58±0.07	0.89±0.09 ^②
pmTOR	1.00±0.00	1.83±0.16 ^①	1.72±0.15	1.26±0.02 ^②
mTOR	1.00±0.00	0.95±0.10 ^①	1.13±0.13	1.19±0.10 ^②

注: ①与 A 组比较 $P<0.05$; ②与 B 组比较 $P<0.05$

Note: ①Compared with group A, $P<0.05$; ②Compared with group B, $P<0.05$

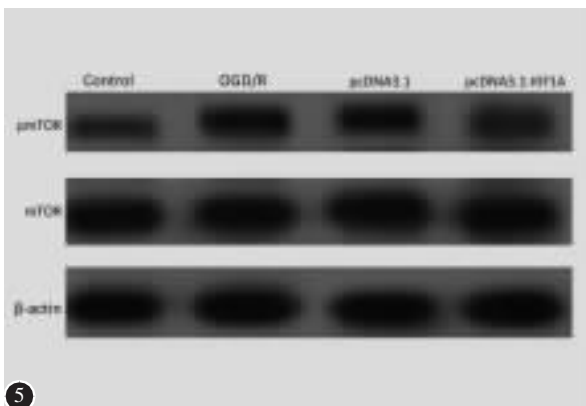


图 5 KIF1A 过表达显著抑制 OGD/R 诱导的 mTOR 通路的表达

Figure 5 KIF1A overexpression significantly suppressed mTOR signal pathway in OGD/R induced PC12 cells

4 参考文献

1. Park S, Park K, Lee Y, et al. New prophylactic and therapeutic strategies for spinal cord injury [J]. J Lifestyle Med, 2013, 3(1): 34-40.
2. Sekhon LH, Fehlings MG. Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury [J]. Spine, 2001, 26(24 Suppl): S2-12.
3. 李俊丽, 赵铎. 脊髓损伤机制研究进展 [J]. 中国实用神经疾病杂志, 2009, 12(34): 72-73.
4. Winter B, Pattani H. Spinal cord injury [J]. Anaesthesia & Intensive Care Medicine, 2011, 12(9): 403-405.
5. Guerit JM, Dion RA. State-of-the-art of neuromonitoring for prevention of immediate and delayed paraplegia in thoracic and thoracoabdominal aorta surgery [J]. Annals of Thoracic Surgery, 2002, 74(5): S1867-1869.

6. Li Y, Gu J, Liu Y, et al. iNOS participates in apoptosis of spinal cord neurons via p-BAD dephosphorylation following ischemia/reperfusion(I/R) injury in rat spinal cord[J]. *Neurosci Lett*, 2013, 545: 117-122.
 7. Okada Y, Yamazaki H, Sekine-Aizawa Y, et al. The neuron-specific kinesin superfamily protein KIF1A is a unique monomeric motor for anterograde axonal transport of synaptic vesicle precursors[J]. *Cell*, 1995, 81(5): 769-780.
 8. Yang ML, Li JJ, So KF, et al. Efficacy and safety of lithium carbonate treatment of chronic spinal cord injuries: a double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial[J]. *Spinal Cord*, 2012, 50(2): 141-146.
 9. Apostolidis A, Thompson C, Yan X, et al. An exploratory, placebo-controlled, dose-response study of the efficacy and safety of onabotulinumtoxinA in spinal cord injury patients with urinary incontinence due to neurogenic detrusor overactivity[J]. *World J Urol*, 2013, 31(6): 1469-1474.
 10. Hirokawa N, Noda Y, Tanaka Y, et al. Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10(10): 682-696.
 11. Ogura K, Asakura T, Goshima Y. Localization mechanisms of the axon guidance molecule UNC-6/Netrin and its receptors, UNC-5 and UNC-40, in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Dev Growth Differ*, 2012, 54(3): 390-397.
 12. Wang J, Zhai W, Yu Z, et al. Neuroprotection exerted by Netrin-1 and Kinesin motor KIF1A in secondary brain injury following experimental intracerebral hemorrhage in rats [J]. *Front Cell Neurosci*, 2017, 11: 432.
 13. Stavoe AK, Hill SE, Hall DH, et al. KIF1A/UNC-104 transports ATG-9 to regulate neurodevelopment and autophagy at synapses[J]. *Dev Cell*, 2016, 38(2): 171-185.
 14. Tanaka Y, Niwa S, Dong M, et al. The molecular motor KIF1A transports the TrkA neurotrophin receptor and is essential for sensory neuron survival and function [J]. *Neuron*, 2016, 90(6): 1215-1229.
 15. 张新颖, 毛景东, 杨晓燕, 等. AMPK/mTOR 信号通路的研究进展[J]. *微生物学杂志*, 2019, 39(3): 109-116.
 16. 许延龙, 武珂鑫, 王前, 等. AMPK-mTOR 信号通路参与百草枯致 PC12 细胞的自噬抑制作用[J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2018, 36(11): 801-807.
 17. Liu L, Sun T, Xin F, et al. Nerve Growth Factor Protects Against Alcohol-Induced Neurotoxicity in PC12 Cells via PI3K/Akt/mTOR Pathway[J]. *Alcohol Alcohol*, 2017, 52(1): 12-18.
 18. Park YS, Park JH, Ko J, et al. mTOR inhibition by rapamycin protects against deltamethrin-induced apoptosis in PC12 cells[J]. *Environ Toxicol*, 2017, 32(1): 109-121.
- (收稿日期:2019-11-22 末次修回日期:2020-03-27)
(英文编审 庄乾宇/谭 啸)
(本文编辑 姜雅浩)

(上接第 364 页)

14. Zhang B, Liu H, Cai X, et al. Biomechanical comparison of modified TARP technique versus modified Goel technique for the treatment of basilar invagination: a finite element analysis[J]. *Spine(Phila Pa 1976)*, 2016, 41(8): E459-466.
 15. Harms J, Melcher RP. Posterior C1-C2 fusion with polyaxial screw and rod fixation[J]. *Spine*, 2001, 26(22): 2467-2471.
 16. Panjabi MM, Crisco JJ, Vasavada A, et al. Mechanical properties of the human cervical spine as shown by three-dimensional load-displacement curves [J]. *Spine*, 2001, 26(24): 2692-2700.
 17. Ito S, Ivancic PC, Panjabi MM, et al. Soft tissue injury threshold during simulated whiplash: a biomechanical investigation[J]. *Spine(Phila Pa 1976)*, 2004, 29(9): 979-987.
 18. Dou N, Lehrman JN, Newcomb AGUS, et al. A novel C2 screw trajectory: preliminary anatomic feasibility and biomechanical comparison[J]. *World Neurosurg*, 2018, 113: e93-e100.
 19. 刘观葵, 叶鹏翰, 张峰. 枢椎棘突、椎板和椎弓根的 CT 测量 [J]. *中国骨与关节损伤杂志*, 2013, 28(5): 401-402.
 20. 刘观葵, 徐荣明, 马维虎, 等. 枢椎棘突螺钉与椎弓根螺钉的解剖学比较[J]. *中国骨伤*, 2011, 24(8): 659-661.
 21. Nagata K, Baba S, Chikuda H, et al. Use of C2 spinous process screw for posterior cervical fixation as substitute for laminar screw in a patient with thin laminae [J]. *BMJ Case Rep*, 2013, 24: 2013. pii: bcr2013009889.
 22. Guppy KH, Brara HS, Bernbeck JA. Occipitocervical fusions in elderly patients: mortality and reoperation rates from a national spine registry[J]. *World Neurosurg*, 2016, 86: 161-167.
 23. Helgeson MD, Lehman RA Jr, Sasso RC, et al. Biomechanical analysis of occipitocervical stability afforded by three fixation techniques[J]. *Spine J*, 2011, 11(3): 245-250.
 24. 廖穗祥, 张东升, 郑勇强, 等. 新型一体化人工枢椎力学性能的有限元分析[J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2019, 29(8): 741-746.
 25. 马飞, 廖晖晖, 王清, 等. 颅底凹陷症伴寰枢椎脱位患者的寰枢椎侧块关节影像学分型[J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2019, 29(7): 613-620.
- (收稿日期:2020-01-07 修回日期:2020-04-14)
(英文编审 谭 啸)
(本文编辑 李伟霞)