

分类号：  
学 号：20222014116

密 级：无  
单位代码：10759

# 石河子大学

## 硕 士 学 位 论 文



### V-ATPase-AMPK 信号轴介导的能量代谢紊乱在 F-53B 致神经细胞毒性中的作用及机制

学 位 申 请 人	张月
指 导 教 师	牛强 教授
申请学位门类级别	医学硕士
学 科、专 业 名 称	公共卫生与预防医学
研 究 方 向	劳动卫生与环境卫生学
所 在 学 院	医学院

中国·新疆·石河子  
2025 年 5 月

分类号：  
学 号：20222014116

密 级：无  
单位代码：10759

# 石河子大学

## 硕 士 学 位 论 文



### V-ATPase-AMPK 信号轴介导的能量代谢紊乱在 F-53B 致神经细胞毒性中的作用及机制

学 位 申 请 人	张月
指 导 教 师	牛强 教授
申请学位门类级别	医学硕士
学 科、专 业 名 称	公共卫生与预防医学
研 究 方 向	劳动卫生与环境卫生学
所 在 学 院	医学院

中国·新疆·石河子  
2025 年 5 月

**The role and mechanism of energy metabolism disorder mediated by  
V-ATPase-AMPK signaling axis in F-53B induced neuronal toxicity**

A Dissertation Submitted to

**Shihezi University**

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

**Master of Medicine**

By

**Zhang Yue**

**(Public Health and Preventive Medicine)**

Dissertation Supervisor: Pro. Niu Qiang

May, 2025

# 石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

## 学位论文独创性声明

本人所呈交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名：张同

时间：2025 年 5 月 20 日

## 使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名：张同

时间：2025 年 5 月 20 日

导师签名：

张同

时间：2025 年 5 月 20 日

## 摘要

目的:

6:2 氯多氟辛烷醚磺酸盐 (6:2 Cl-PFESA, F-53B) 是一种新型污染物, 在环境中广泛分布, 流行病学证据提示暴露与神经损伤相关, 但 F-53B 致神经毒性的机制尚未明确。本研究旨在探究 F-53B 对神经细胞能量代谢的影响, 重点探究对 V-ATPase-AMPK 信号轴的调控作用, 为 F-53B 致神经毒性的防控提供理论依据。

方法:

使用 F-53B (0、2.5、5.0 和 10.0  $\mu\text{M}$ ) 处理小鼠星形胶质细胞 (mouse astrocytes, C8-D1A) 和人神经母细胞瘤细胞 (human neuroblastoma cells, SH-SY5Y), 构建体外染毒模型。通过 CCK-8 法测定细胞活力。化学发光法检测 ATP 水平。Mito-Tracker Green 和 MitoSOX Red 探针检测线粒体活性氧 (mitochondrial ROS, mROS) 含量; JC-1 探针检测线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP)。微量法检测呼吸链复合体 I 活性。酶联免疫法检测 V-ATPase 活性。LysoSensor™ Yellow/Blue DND-160 (PDMPO) 探针检测溶酶体 pH; Lyso-Tracker Red 和 Fluo-3AM 探针检测溶酶体钙离子 ( $\text{Ca}^{2+}$ )。通过免疫印迹法 (western blotting, WB) 检测溶酶体相关蛋白液泡  $\text{H}^+$ -ATP 酶 B2 亚基 (ATPase  $\text{H}^+$  transporting V1 subunit B2, V-ATPase B2)、瞬时受体电位通道粘蛋白 1 (transient receptor potential mucolipin 1, TRPML1)、溶酶体钙离子的外排通过钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶激酶 2 (calcium/calmodulin dependent protein kinase kinase 2, CaMKK2)、能量调节蛋白腺苷酸活化蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK) 及其磷酸化形式 (phosphorylated AMP-activated protein kinase, p-AMPK)、泛醌 NADH 脱氢酶 Fe-S 蛋白 1 (NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein, NDUFS1) 和糖酵解关键蛋白 6-磷酸果糖-2-激酶/果糖-2, 6-二磷酸酶 3 (6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-biphosphatase 3, PFKFB3) 表达水平。此外, 使用 V-ATPase B2 过表达腺病毒处理细胞 48 h, F-53B 染毒 24 h 构建分子干预模型, 通过 WB 检测溶酶体相关蛋白 (V-ATPase B2、TRPML1、CaMKK2) 及 p-AMPK 蛋白表达; 探针检测溶酶体 pH 和  $\text{Ca}^{2+}$  含量; 酶联免疫法检测 V-ATPase 活性; 化学发光法检测 ATP 水平。使用白藜芦醇 (resveratrol, RSV) 预处理细胞 2 h, F-53B 染毒 24 h 构建化学干预模型, 通过 WB 检测能量代谢相关蛋白 (p-AMPK、NDUFS1 和 PFKFB3) 表达; 探针检测 mROS 和 MMP; 微量法检测呼吸链复合体 I 活性; 化学发光法检测 ATP 水平。

结果:

1. F-53B 暴露导致神经细胞活力下降: 与对照组相比, C8-D1A 和 SH-SY5Y 细胞 10.0  $\mu\text{M}$  F-53B 组细胞活力均显著下降 ( $P < 0.05$ )。

2. F-53B 暴露导致神经细胞线粒体损伤及 ATP 含量减少: 与对照组相比, C8-D1A 和 SH-SY5Y 细胞 10.0  $\mu\text{M}$  F-53B 组 mROS 含量显著增加 ( $P < 0.05$ )。与对照组相比, 两种细胞 10.0  $\mu\text{M}$  F-53B 组 MMP 显著降低 ( $P < 0.05$ )。与对照组相比, 两种细胞 10.0  $\mu\text{M}$  F-53B 组 ATP 水平显著降低 ( $P$

< 0.05)。

3. F-53B 暴露抑制神经细胞 AMPK 的激活和能量代谢途径: 与对照组相比, C8-D1A 和 SH-SY5Y 细胞 10.0  $\mu\text{M}$  F-53B 组 p-AMPK、NDUFS1、PFKFB3 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ )。与对照组相比, 两种细胞 10.0  $\mu\text{M}$  F-53B 组呼吸链复合体 I 的活性显著降低 ( $P < 0.05$ )。

4. F-53B 暴露升高神经细胞溶酶体 pH 并减少溶酶体  $\text{Ca}^{2+}$  释放: 与对照组相比, C8-D1A 和 SH-SY5Y 细胞 10.0  $\mu\text{M}$  F-53B 组 V-ATPase B2、TRPML1 和 CaMKK2 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ )。与对照组相比, 两种细胞 10.0  $\mu\text{M}$  F-53B 组 V-ATPase 活性显著降低 ( $P < 0.05$ )。与对照组相比, 两种细胞 10.0  $\mu\text{M}$  F-53B 组溶酶体 pH 显著升高 ( $P < 0.05$ )。与对照组相比, 两种细胞 10.0  $\mu\text{M}$  F-53B 组溶酶体内  $\text{Ca}^{2+}$  含量显著增加 ( $P < 0.05$ )。

5. V-ATPase B2 过表达恢复神经细胞溶酶体 pH 和溶酶体  $\text{Ca}^{2+}$  释放: 与空载+10.0  $\mu\text{M}$  F-53B 组相比, C8-D1A 和 SH-SY5Y 细胞 V-ATPase B2 过表达+10.0  $\mu\text{M}$  F-53B 组 V-ATPase B2、TRPML1 和 CaMKK2 蛋白表达显著升高 ( $P < 0.05$ )。与空载+10.0  $\mu\text{M}$  F-53B 组相比, 两种细胞 V-ATPase B2 过表达+10.0  $\mu\text{M}$  F-53B 组 V-ATPase 活性显著升高 ( $P < 0.05$ )。与空载+10.0  $\mu\text{M}$  F-53B 组相比, 两种细胞 V-ATPase B2 过表达+10.0  $\mu\text{M}$  F-53B 组溶酶体 pH 显著降低 ( $P < 0.05$ )。与空载+10.0  $\mu\text{M}$  F-53B 组, 两种细胞 V-ATPase B2 过表达+10.0  $\mu\text{M}$  F-53B 组溶酶体  $\text{Ca}^{2+}$  含量降低 ( $P < 0.05$ )。

6. V-ATPase B2 过表达恢复神经细胞 AMPK 的活性及 ATP 含量: 与空载+10.0  $\mu\text{M}$  F-53B 组相比, C8-D1A 和 SH-SY5Y 细胞 p-AMPK 蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ )。与空载+10.0  $\mu\text{M}$  F-53B 组相比, 两种细胞 V-ATPase B2 过表达+10.0  $\mu\text{M}$  F-53B 组溶酶体内  $\text{Ca}^{2+}$  含量显著减少 ( $P < 0.05$ )。与空载+10.0  $\mu\text{M}$  F-53B 组相比, 两种细胞 ATP 水平显著升高 ( $P < 0.05$ )。

7. RSV 恢复神经细胞 AMPK 的激活和能量代谢途径: 与 10.0  $\mu\text{M}$  F-53B 组相比, C8-D1A 和 SH-SY5Y 细胞 RSV+10.0  $\mu\text{M}$  F-53B 组 p-AMPK、NDUFS1、PFKFB3 蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ )。与 10.0  $\mu\text{M}$  F-53B 组相比, 两种细胞 RSV+10.0  $\mu\text{M}$  F-53B 组呼吸链复合体 I 的活性显著升高 ( $P < 0.05$ )。

8. RSV 恢复神经细胞线粒体功能及 ATP 含量: 与 10.0  $\mu\text{M}$  F-53B 组相比, C8-D1A 和 SH-SY5Y 细胞 RSV+10.0  $\mu\text{M}$  F-53B 组 mROS 水平降低 ( $P < 0.05$ )。与 10.0  $\mu\text{M}$  F-53B 组相比, 两种细胞 RSV+10.0  $\mu\text{M}$  F-53B 组 MMP 升高 ( $P < 0.05$ )。与 10.0  $\mu\text{M}$  F-53B 组相比, 两种细胞 RSV+10.0  $\mu\text{M}$  F-53B 组 ATP 水平显著升高 ( $P < 0.05$ )。

结论:

F-53B 通过抑制 V-ATPase-AMPK 信号轴以及损伤溶酶体、线粒体稳态, 最终引发神经细胞能量代谢紊乱, ATP 含量减少。激活 V-ATPase 能够调节溶酶体 pH 和  $\text{Ca}^{2+}$  稳态, 促进 AMPK 磷酸化, 恢复 ATP 含量。RSV 通过激活 AMPK 和恢复线粒体功能, 也有效缓解了 ATP 的降低。这些发现为预防和治疗 F-53B 导致的神经毒性提供了新的策略和思路。

**关键词:** F-53B; 神经毒性; V-ATPase-AMPK 信号轴; 能量代谢

## Abstract

### Objective:

6: 2-chloroperfluorooctane ether sulfonate (6:2 Cl PFESA, F-53B) is a novel pollutant widely distributed in the environment. Epidemiological evidence suggests that its exposure is associated with nerve damage, but its neurotoxic mechanism is not yet clear. The aim of this study is to investigate the effect of F-53B on neuronal energy metabolism, with a focus on the regulatory role of the V-ATPase-AMPK signaling axis, providing a theoretical basis for the prevention and control of F-53B induced neurotoxicity.

### Methods:

Mouse astrocytes (C8-D1A) and human neuroblastoma cells (SH-SY5Y) were treated with F-53B (0, 2.5, 5.0, and 10.0  $\mu$ M F-53B) to construct the infection model. Cell viability was measured by CCK-8 assay. The levels of mitochondrial reactive oxygen species (mROS) were detected by Mito-Tracker Green and MitoSOX Red. The mitochondrial membrane potential (MMP) was detected by JC-1. Microassay was used to detect the activity of respiratory chain complex I. Enzyme linked immunosorbent assay was used to detect V-ATPase activity. LysoSensor™ Yellow/Blue DND-160 (PDMPO) was used to detect lysosomal pH. Lyso-Tracker Red and Fluo-3AM were used to detect lysosomal  $Ca^{2+}$  level. Western blotting (WB) was used to detect the expression levels of lysosomal associated protein vacuolar  $H^+$ -ATPase B2 subunit (V-ATPase B2), transient receptor potential mucolipin 1 (TRPML1) and lysosomal  $Ca^{2+}$  efflux via calcium/calmodulin dependent protein kinase kinase 2 (CaMKK2), the energy-related protein AMP-activated protein kinase (AMPK) and its phosphorylated form (p-AMPK), NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 1 (NDUFS1) and the key glycolytic protein 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-biphosphatase 3 (PFKFB3). In addition, a molecular intervention model was constructed by treating cells with adenovirus overexpressing V-ATPase B2 for 48 hours and F-53B for 24 hours. The expression of lysosome related proteins (V-ATPase B2, TRPML1, CaMKK2) and AMPK pathway proteins was detected by WB. Probe detection of lysosome pH and  $Ca^{2+}$  levels. Enzyme linked immunosorbent assay was used to detect V-ATPase activity. Chemiluminescence method was used to detect ATP levels. A chemical intervention model was constructed by pre-treating cells with resveratrol (RSV) for 2 hours and exposing them to F-53B for 24 hours. The expression of energy metabolism related proteins (p-AMPK, NDUFS1 and PFKFB3) was detected by WB. Probe detection of mROS and MMP; Microassay detection of respiratory chain complex I activity; Chemiluminescence method was used to detect ATP levels.

### Results:

1. F-53B exposure resulted in decreased nerve cell viability: Compared with the control group, the cell viability of C8-D1A and SH-SY5Y cell treated with 10.0  $\mu$ M F-53B was significantly decreased ( $P < 0.05$ ).

2. F-53B exposure caused mitochondrial damage and decreased ATP levels of nerve cells: Compared with the control group, the mROS levels in 10.0  $\mu\text{M}$  F-53B group of C8-D1A and SH-SY5Y cells were significantly increased ( $P < 0.05$ ). Compared with the control group, MMP in 10.0  $\mu\text{M}$  F-53B group of two kinds of cells was significantly decreased ( $P < 0.05$ ). Compared with the control group, the ATP levels in the 10.0  $\mu\text{M}$  F-53B group of two kinds of cells were significantly decreased ( $P < 0.05$ ).

3. F-53B exposure inhibited AMPK activation and energy metabolism pathway of nerve cells: Compared with the control group, the expression levels of p-AMPK, NDUFS1 and PFKFB3 in 10.0  $\mu\text{M}$  F-53B group of C8-D1A and SH-SY5Y cells were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). Compared with the control group, the activity of respiratory chain complex I in 10.0  $\mu\text{M}$  F-53B group of two kinds of cells was significantly decreased ( $P < 0.05$ ).

4. F-53B exposure increased lysosomal pH and decreased lysosomal  $\text{Ca}^{2+}$  release in nerve cells: Compared with the control group, the expression levels of V-ATPase B2, TRPML1 and CaMKK2 in 10.0  $\mu\text{M}$  F-53B group of C8-D1A and SH-SY5Y cells were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). Compared with the control group, the V-ATPase activity in 10.0  $\mu\text{M}$  F-53B group of two kinds of cells was significantly decreased ( $P < 0.05$ ). Compared with the control group, the lysosomal pH of 10.0  $\mu\text{M}$  F-53B group was significantly increased ( $P < 0.05$ ). Compared with the control group, the  $\text{Ca}^{2+}$  content of lysozyme in 10.0  $\mu\text{M}$  F-53B group was significantly increased ( $P < 0.05$ ).

5. Overexpression of V-ATPase B2 restored lysosomal pH and lysosomal  $\text{Ca}^{2+}$  release in nerve cells: Compared with Ad-null+10.0  $\mu\text{M}$  F-53B, Ad-V-ATPase B2+10.0  $\mu\text{M}$  F-53B group in C8-D1A and SH-SY5Y cells, V-ATPase B2, TRPML1, CaMKK2 protein expressions were significantly increased ( $P < 0.05$ ). Compared with Ad-null+10.0  $\mu\text{M}$  F-53B group, the activity of Ad-V-ATPase B2+10.0  $\mu\text{M}$  F-53B group in two kinds of cells was significantly increased ( $P < 0.05$ ). Compared with that of Ad-null+10.0  $\mu\text{M}$  F-53B group, the lysosomal pH of Ad-V-ATPase B2+10.0  $\mu\text{M}$  F-53B group was significantly decreased ( $P < 0.05$ ). Compared with Ad-null+10.0  $\mu\text{M}$  F-53B group the lysosomal  $\text{Ca}^{2+}$  levels decreased in Ad-V-ATPase B2+10.0  $\mu\text{M}$  F-53B group ( $P < 0.05$ ).

6. Overexpression of V-ATPase B2 restored AMPK activity and ATP levels in nerve cells: Compared with Ad-null+10.0  $\mu\text{M}$  F-53B group, p-AMPK protein expression in C8-D1A and SH-SY5Y cells was significantly increased ( $P < 0.05$ ). Compared with Ad-null+10.0  $\mu\text{M}$  F-53B group, the  $\text{Ca}^{2+}$  levels in lysosomes of the two cells with Ad-V-ATPase B2+10.0  $\mu\text{M}$  F-53B group was significantly decreased ( $P < 0.05$ ). Compared with Ad-null+10.0  $\mu\text{M}$  F-53B group, the ATP levels of two kinds of cells were significantly increased ( $P < 0.05$ ).

7. RSV restored AMPK activity and energy metabolism pathways in nerve cells: Compared with 10.0  $\mu\text{M}$  F-53B group, the expression levels of p-AMPK, NDUFS1 and PFKFB3 in C8-D1A and SH-SY5Y cells of RSV+10.0  $\mu\text{M}$  F-53B group was significantly increased ( $P < 0.05$ ). Compared with 10.0  $\mu\text{M}$  F-53B

group, the activity of mitochondrial respiratory chain complex I in RSV+10.0  $\mu$ M F-53B group was significantly increased ( $P < 0.05$ ).

8. RSV restored mitochondrial function and ATP levels in nerve cells: Compared with 10.0  $\mu$ M F-53B group, the mROS levels in RSV+10.0  $\mu$ M F-53B group of C8-D1A and SH-SY5Y cells was decreased ( $P < 0.05$ ). Compared with 10.0  $\mu$ M F-53B group, JC-1 staining results showed that MMP in RSV+10.0  $\mu$ M F-53B group was higher ( $P < 0.05$ ). Compared with 10.0  $\mu$ M F-53B group the ATP levels in RSV+10.0  $\mu$ M F-53B group was significantly higher ( $P < 0.05$ ).

Conclusion:

F-53B inhibits the V-ATPase-AMPK signaling axis and damages lysosomal and mitochondrial homeostasis, ultimately leading to disturbances in neuronal energy metabolism and a decrease in ATP levels. Activation of V-ATPase can regulate lysosomal pH and  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis, promote AMPK phosphorylation, and restore ATP levels. RSV effectively alleviates the decrease in ATP by activating AMPK and restoring mitochondrial function. These findings can provide new strategies and ideas for preventing and treating neurotoxicity caused by F-53B.

**Key words:** F-53B; neurotoxicity; V-ATPase-AMPK signaling axis; energy metabolism

# 目录

摘 要.....	I
Abstract.....	III
主要英文缩略词表.....	VII
1. 前言.....	1
2. 材料与方法.....	4
2.1 主要仪器、试剂及耗材.....	4
2.2 相关试剂的配制.....	5
2.3 细胞培养与处理.....	6
2.4 实验方法.....	7
2.5 统计分析.....	12
3. 结果.....	13
3.1 F-53B 暴露致神经细胞活力下降.....	13
3.2 F-53B 暴露导致神经细胞线粒体损伤及 ATP 含量减少.....	13
3.3 F-53B 暴露抑制神经细胞 AMPK 的激活和能量代谢途径.....	15
3.4 F-53B 暴露升高神经细胞溶酶体 pH 并减少溶酶体 Ca <sup>2+</sup> 释放.....	18
3.5 V-ATPase B2 过表达恢复神经细胞溶酶体 pH 和溶酶体 Ca <sup>2+</sup> 释放.....	22
3.6 V-ATPase B2 过表达恢复神经细胞 AMPK 的活性及 ATP 含量.....	26
3.7 RSV 恢复神经细胞 AMPK 的激活和细胞能量代谢途径.....	28
3.8 RSV 恢复神经细胞线粒体功能和 ATP 含量.....	31
4. 讨论.....	34
5. 结论.....	38
6. 局限性与展望.....	39
文献综述.....	40
参考文献.....	45
致谢.....	56
作者简介.....	57

## 主要英文缩略词表

缩写	英文全称	中文全称
Ad	Adenovirus	腺病毒
AMPK	AMP-activated protein kinase	腺苷酸活化蛋白激酶
AP	Ammonium persulfate	过硫酸铵
ATP	Adenosine triphosphate	5'-三磷酸腺苷
BSA	Bovine Serum Albumin	牛血清白蛋白
CaMKK2	Recombinant Calcium/Calmodulin Dependent Protein Kinase Kinase 2	钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶激酶 2
CCK-8	Cell counting kit-8	细胞活力检测
C8-D1A	Astrocytes	小鼠星形胶质细胞
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium	改良型 Eagle 培养基
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
F-53B	6:2 Cl-PFESA	铬雾抑制剂
mROS	Mitochondrial ROS	线粒体活性氧
MMP	Mitochondrial membrane potential	线粒体膜电位
NDUFS1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein	泛醌 NADH 脱氢酶 Fe-S 蛋白 1
p-AMPK	Phosphorylated AMP-activated protein kinase	磷酸化腺苷酸活化蛋白激酶
PBS	Phosphate buffer saline	磷酸盐缓冲剂
PFKFB3	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-biphosphatase 3	6-磷酸果糖-2-激酶/果糖-2, 6-二磷酸酶 3
PMSF	Phenylmethyl-sulfonyl fluoride	苯甲基磺酰氟
PVDF	Polyvinylidene fluoride	聚偏二氟乙烯膜
RSV	Resveratrol	白藜芦醇
SDS	Sodium dodecyl sulfonate	十二烷基磺酸钠
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳

## 主要英文缩略词表续表

缩写	英文全称	中文全称
SH-SY5Y	Human neuroblastoma cells	人神经母细胞瘤细胞
TBST	Tris-buffered saline containing 0.05% tween-20	洗脱缓冲液
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine	四甲基乙二胺
TRPML1	Transient receptor potential mucolipin 1	瞬时受体电位通道粘蛋白 1
Tris	Tris (Hydroxymethyl) aminomethane	1 三羟甲基氨基甲烷
V-ATPase	Vacuolar H <sup>+</sup> -ATPase	液泡 H <sup>+</sup> -ATP 酶

## 1. 前言

全氟辛烷磺酸（perfluorooctane sulfonate, PFOS）于 2004 年被纳入《关于持久性有机污染物的斯德哥尔摩公约》受控物质清单<sup>[1]</sup>，自 2023 年 3 月 1 日起，中国实施的《重点管控新污染物清单（2023 年版）》也将 PFOS 列为管控对象<sup>[2]</sup>。随着 PFOS 的使用受到严格限制，其替代品 6:2 氯多氟辛烷醚磺酸盐（6:2 Cl-PFESA, F-53B）的应用更加广泛<sup>[3]</sup>。F-53B 于 20 世纪 70 年代首次合成，自 2013 年首次发表关于其持久性、毒性和环境污染的报告<sup>[4]</sup>，目前已引起研究者的广泛关注。研究表明，F-53B 存在于多种自然环境中，如地表水<sup>[5]</sup>、污水污泥<sup>[6]</sup>和大气<sup>[7]</sup>。在中国温州市镀铬工业的废水中发现高浓度 F-53B（出水和进水分别为 43-78 和 65-112  $\mu\text{g/L}$ ）<sup>[4]</sup>。韩国的一项调查显示，在 2012-2018 年间，黑尾鸥蛋中 F-53B 含量呈现逐年上升趋势<sup>[8]</sup>。在格陵兰海洋动物中也检测到 F-53B 的存在<sup>[9]</sup>。动物实验表明 F-53B 具有中等毒性  $\text{LC}_{50}$ （96 h, 15.5 mg/L），且不易降解<sup>[4]</sup>。流行病学研究表明在金属电镀工人中检测到的 F-53B 浓度高达 5040 ng/mL，并发现 F-53B 是迄今为止在人体血液中最具生物持久性的全氟烷基物质（perfluoroalkyl substances, PFAS），机体内完全消除时间为 15.3 年<sup>[10-11]</sup>。这些发现表明，F-53B 的污染问题已在全球范围内显现。目前有多项研究表明 F-53B 可导致血脂<sup>[12]</sup>和血糖<sup>[13]</sup>代谢、生殖发育<sup>[14-15]</sup>、甲状腺功能<sup>[16]</sup>，心脏发育<sup>[17]</sup>，肝脏功能<sup>[18]</sup>和神经系统功能异常<sup>[10,19]</sup>，因此，F-53B 的健康风险应当引起公众的高度关注。

神经系统是环境污染物最敏感的靶标之一。神经细胞作为神经系统的基本结构和功能单位，属于不可再生细胞，一旦死亡就难以再生<sup>[20]</sup>，因此研究 F-53B 对神经系统的影响是十分必要的。F-53B 可以穿过血-脑脊液屏障并在脑脊液中积累，对神经功能产生不良效应<sup>[21]</sup>。现况研究表明，新生儿脑脊液中 F-53B 浓度与其头围呈显著负相关<sup>[22]</sup>。队列研究表明，F-53B 的早期暴露与婴儿 6 个月时通信域评分不佳相关<sup>[23]</sup>。体外研究表明，在早期神经分化过程中，F-53B 会破坏神经标记基因的表达并影响分化细胞的形态<sup>[19]</sup>，揭示了 F-53B 存在潜在的发育神经毒性。体内研究表明，F-53B 降低了斑马鱼斑点下多巴胺能神经元的丰度，虽没有达到统计学意义但倾向于降低线粒体功能，最终导致斑马鱼较低的运动状态<sup>[24]</sup>。值得注意的是，通过对比研究结果，发现 F-53B 可能存在比 PFOS 更强的毒效应<sup>[10]</sup>。随着 F-53B 使用的增加，不仅加大了对环境的危害，对人类健康的潜在风险也在上升。目前已经证实了 F-53B 具有神经毒性，但具体的分子机制仍需深入研究。

大脑是人体消耗能量最多的器官，研究表明大约有 20%-25% 的人体能量用于维持其正常工作<sup>[25]</sup>。腺苷三磷酸（adenosine triphosphate, ATP）是大脑可以直接利用的能量分

子, 由于大脑不能储存 ATP, 且对能量的需求较大, 因此大脑的能量提供很大程度上依赖称为细胞“动力工场”的线粒体, 而糖酵解也会产生部分 ATP, 共同维持细胞正常功能。线粒体可以通过氧化磷酸化产生大量 ATP<sup>[26]</sup>, 因此, 线粒体稳态对维持神经细胞的功能至关重要<sup>[27]</sup>。当线粒体受损时, 如线粒体活性氧(mitochondrial reactive oxygen species, mROS)增加、ATP 生成减少、线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP)降低、氧化磷酸化过程解偶联和线粒体肿胀可能会使神经细胞供能不足, 进而导致代谢紊乱和神经退行性疾病的发生和发展<sup>[28-29]</sup>。虽然目前尚缺乏 F-53B 对神经细胞能量代谢影响的证据, 但体内实验发现, PFOS 通过抑制腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)相关自噬, 诱发肝脏脂质积聚<sup>[30]</sup>。体外实验发现, PFOS 会导致滋养层细胞 ATP 含量下降、线粒体功能损伤并抑制细胞呼吸功能, 最终导致能量代谢障碍<sup>[31]</sup>。AMPK 作为细胞能量代谢和线粒体稳态的关键调控通路, 其在维持能量平衡中发挥着至关重要的作用。AMPK 被激活后会正向调节补充 ATP 供应的信号轴, 同时会抑制 ATP 的消耗途径<sup>[32]</sup>。此外, 研究表明 F-53B 通过破坏线粒体的结构和功能, 促进活性氧生成致细胞凋亡<sup>[33]</sup>。而通过激活 AMPK 来缓解脂质代谢紊乱, 恢复线粒体的稳态已被证实可行<sup>[34-35]</sup>, 因此能量调节关键蛋白 AMPK 在 F-53B 致神经毒性这一过程中的作用机制亟待继续研究。

作为多种分子信号传递平台, 溶酶体对维持神经元的稳态至关重要, 尤其是 pH 和钙稳态<sup>[36-38]</sup>。Ca<sup>2+</sup>在细胞能量代谢中扮演核心角色, 动物实验发现, 溶酶体 Ca<sup>2+</sup>通过钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶激酶 2(calcium/calmodulin dependent protein kinase kinase 2, CaMKK2)途径间接激活 AMPK, 减少肝脏脂肪堆积<sup>[39]</sup>。溶酶体膜上的非选择性阳离子通道瞬时受体电位粘脂蛋白 1(transient receptor potential mucolipin 1, TRPML1)负责调控溶酶体腔内 Ca<sup>2+</sup>的排出<sup>[40]</sup>, 有研究通过使用 TRPML1 抑制剂限制溶酶体中 Ca<sup>2+</sup>的释放, 证明溶酶体 Ca<sup>2+</sup>参与了胰岛素抵抗<sup>[40]</sup>。TRPML1 蛋白的激活还可减轻线粒体损伤和氧化应激, 缓解内皮功能障碍<sup>[41]</sup>。而 TRPML1 蛋白的表达受到溶酶体 pH 的调节<sup>[42]</sup>。溶酶体内的酸性环境(pH: 4.5-5.0)的维持涉及多个离子通道<sup>[43]</sup>, 其中最值得注意的是溶酶体 H<sup>+</sup>-ATP 酶(ATPase H<sup>+</sup> transporting V1 subunit B2, V-ATPase)<sup>[44]</sup>。有研究表明晚期糖基化终产物会通过抑制 V-ATPase 的活性升高溶酶体 pH, 最终导致神经细胞凋亡<sup>[45]</sup>。研究证实了 V-ATPase-调节因子-AXIN-LKB1 复合体可以激活 AMPK, 调节能量代谢<sup>[46]</sup>。细胞实验发现奥美拉唑可以抑制 V-ATPase 的表达和 AMPK 的激活, 最终抑制 CD4<sup>+</sup> T 细胞的克隆扩增<sup>[47]</sup>。石胆酸可以激活 TULP3-sirtuin-V-ATPase-AMPK 通路延缓衰老<sup>[48]</sup>, 这表明了 V-ATPase 也是 AMPK 激活的关键, V-ATPase-AMPK 信号轴可以被认为是调节细胞能量代谢等多种生理和病理过程中发挥着关键作用。V-ATPase 是一种多聚体蛋白质复合物, 包括 V0 和 V1 两个部分。V1 驱动 V0 进行质子泵活动<sup>[49]</sup>。V-ATPase B2 亚基被证实参与溶酶体酸化过程。有研究表明 V-ATPase B2 过表达可以缓解氟化物导致的

溶酶体碱化,减少神经细胞的凋亡<sup>[50]</sup>。在 Lee J 等人<sup>[51]</sup>的研究表明 V-ATPase B2 过表达,有助于促进溶酶体活性,从而防止氧化应激诱导的细胞死亡并减轻实验性肺损伤/纤维化。尽管如此,F-53B 对溶酶体 V-ATPase 活性的影响未知,V-ATPase-AMPK 信号轴在 F-53B 致神经毒性这一过程中的作用机制也尚未明确。

白藜芦醇(resveratrol, RSV)被认为是 AMPK 的天然激活剂<sup>[52-53]</sup>。RSV 作为一种天然的生物活性多酚,具有抗炎、抗氧化、降血脂等功效<sup>[54]</sup>,可以增加线粒体数量,改善高脂小鼠的健康状况<sup>[55]</sup>。研究表明 RSV 通过激活 AMPK/Sirt1-Foxo1 通路减轻肝细胞氧化损伤<sup>[56]</sup>。总体而言,作为能够影响能量代谢和线粒体功能的物质,RSV 对提升身体健康具有潜在益处。然而,在 F-53B 暴露下,RSV 对 AMPK 的影响并不清楚,值得进一步探索。

综上,V-ATPase-AMPK 信号轴在调节神经细胞的能量代谢中扮演着关键角色。然而,V-ATPase-AMPK 信号轴在 F-53B 致神经细胞毒性中的作用及机制尚不清楚。因此,本研究通过构建不同 F-53B 剂量染毒(0、2.5、5.0、10.0  $\mu\text{M}$ )的小鼠星形胶质细胞(mouse astrocytes, C8-D1A)和人神经母细胞瘤细胞(human neuroblastoma cells, SH-SY5Y)细胞体外模型,并通过 V-ATPase B2 过表达腺病毒转染和 RSV 构建干预模型,分别对 V-ATPase 和 AMPK 进行干预,旨在深入探究 V-ATPase-AMPK 信号轴在 F-53B 致神经细胞能量代谢异常中的作用和机制,为预防和治疗 F-53B 引起的神经毒性提供重要的科学依据。

## 2. 材料与amp;方法

### 2.1 主要仪器、试剂及耗材

本实验所使用的仪器见表 2-1。

表 2-1 实验的主要仪器

仪器名称	型号	生产厂家
超生波细胞粉碎机	SCIENTZ-IIID	宁波新芝生物科技股份有限公司
恒温水浴箱	SHA-B	常州国华仪器厂
离心机	TGL-16G-A	湖南湘仪实验室仪器开发有限公司
电子天平	CPA	北京赛多利斯仪器系统有限公司
激光共聚焦显微镜	Nikon AX with NSPARC	尼康精机有限公司
全波长扫描式多功能读数仪	Varioskan Flash	美国 Thermo 公司
恒温震荡摇床	-	上海生物科技有限公司
CO <sub>2</sub> 恒温培养箱	Thermo Forma 3111	美国 Thermo 公司
高压蒸汽灭菌器	TX400Z	上海三申医疗器械有限公司
化学发光仪	Tanon-5200	上海天能公司
电泳仪	DYCZ-40	伯乐生命医学产品（上海）有限公司
电转仪	DYCZ-40	伯乐生命医学产品（上海）有限公司
酶标仪	mμISKANMK3	美国 Thermo 公司
微量移液器	-	美国 Eppendorf 公司

表 2-2 实验的试剂及耗材

试剂名称	生产厂家
F-53B	上海迈坤化工有限公司
V-ATPase B2 过表达腺病毒	山东维真生物科技有限公司
RSV	北京索莱宝科技有限公司
胎牛血清	以色列 Biological Industries 公司
V-ATPase B2 抗体	圣克鲁斯生物技术（上海）有限公司
TRPML1 抗体	美国 Thermo 公司
CaMKK2、PFKFB3、NDUFS1 抗体	武汉三鹰生物技术有限公司