

# Ghrelin 基因敲除对小鼠黑质区多巴胺能神经元突触后电位的影响

刘静 李焕焕 焦倩 陈曦 姜宏 杜希恂

(青岛大学国家生理学重点(培育)学科,山东 青岛 266071)

**[摘要]** 目的 探讨胃饥饿素(*ghrelin*)基因敲除对小鼠黑质多巴胺能神经元突触后电位的影响。方法 分别选取 10 周龄雄性 *ghrelin* 基因敲除小鼠(*ghrelin*<sup>-/-</sup>组)及其同窝雄性野生型(WT)小鼠(WT组)的黑质组织,采用转录组学测序(RNA-seq)技术筛选差异表达基因(DEGs),通过 KEGG 通路富集分析 DEGs 可能参与的神经元突触活动相关信号通路,采用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)方法对筛选出的 DEGs 进行验证,并应用蛋白免疫印迹(Western blotting)方法检测神经元突触活动相关基因的蛋白表达情况。结果 与 WT 组相比,*ghrelin*<sup>-/-</sup>组小鼠多巴胺能神经元突触传递信号通路上的 23 个基因水平发生了显著性变化,其中谷氨酸促离子型受体  $\alpha$ -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异噁唑丙酸型亚基 3(*GluA3*)和糖原合酶激酶-3 $\beta$ (*GSK-3\beta*)分别调控神经元突触后膜上的  $\alpha$ -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异噁唑丙酸受体和 N-甲基-D-天冬氨酸受体;在 *ghrelin*<sup>-/-</sup>组小鼠黑质组织中,*GluA3* 和 *GSK-3\beta* 基因表达出现明显的下调。RT-qPCR 方法检测结果显示,与 WT 组相比,*ghrelin*<sup>-/-</sup>组小鼠黑质组织当中 *GluA3* 和 *GSK-3\beta* mRNA 水平明显下调( $t=2.408, 2.740, P<0.05$ )。Western blotting 方法检测结果显示,与 WT 组相比,*ghrelin*<sup>-/-</sup>组小鼠黑质组织中 *GluA3* 蛋白的表达水平明显上调( $t=2.530, P<0.05$ ),*GSK-3\beta* 蛋白的表达明显下调( $t=3.469, P<0.05$ )。结论 *Ghrelin* 基因敲除可能通过使小鼠黑质多巴胺能神经元突触后电位长时程增强,从而增强兴奋性突触传递活动,参与运动调控。

**[关键词]** 胃促生长素;基因敲除技术;黑质;多巴胺能神经元;长时程增强;受体,离子型谷氨酸

**[中图分类号]** R338.1;R394

**[文献标志码]** A

## Effect of *ghrelin* gene knockout on the postsynaptic potential of dopaminergic neurons in the substantia nigra of mice

LIU Jing, LI Huanhuan, JIAO Qian, CHEN Xi, JIANG Hong, DU Xixun (State Key (Cultivation) Disciplines of Physiology, Qingdao University, Qingdao 266071, China)

**[ABSTRACT]** **Objective** To study the effect of *ghrelin* gene knockout on the postsynaptic potential of dopaminergic neurons in the substantia nigra of mice. **Methods** Substantia nigra tissue was taken from 10-week-old *ghrelin*<sup>-/-</sup> male mice (*ghrelin*<sup>-/-</sup> group) and their male wild-type (WT) littermates (WT group). RNA-seq technique was used to screen differently expressed genes (DEGs). KEGG pathway enrichment analysis was performed for the neuronal synaptic activity-associated signaling pathways which DEGs might be involved in. Quantitative real-time PCR (RT-qPCR) was used for validation of the identified DEGs, and western blotting was used for protein expression of neuronal synaptic activity-related genes. **Results** Compared with the WT group, the *ghrelin*<sup>-/-</sup> group had significant changes in the expression levels of 23 genes in the synaptic signaling pathway of dopaminergic neurons. Specifically, Ionotropic glutamate receptors  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid type subunit 3 (*GluA3*) and glycogen synthase kinase3- $\beta$  (*GSK-3\beta*) regulated  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptor and N-methyl-D-aspartic acid receptor on the postsynaptic membrane of neurons, respectively. *GluA3* and *GSK-3\beta* genes were significantly downregulated in the substantia nigra tissue of mice in the *ghrelin*<sup>-/-</sup> group. RT-qPCR results showed that compared to the WT group, the *ghrelin*<sup>-/-</sup> group had significant downregulation of the mRNA expression levels of *GluA3* and *GSK-3\beta* in the substantia nigra tissue of mice ( $t=2.408, 2.740, P<0.05$ ). Western blotting results showed that compared with the WT group, the *ghrelin*<sup>-/-</sup> group had a significantly upregulated expression level of *GluA3* protein ( $t=2.530, P<0.05$ ) and a significantly downregulated expression level of *GSK-3\beta* protein ( $t=3.469, P<0.05$ ) in the substantia nigra tissue of mice. **Conclusion** *Ghrelin* gene knockout may enhance the excitatory synaptic transmission activity by enhancing the postsynaptic potential of substantia nigra dopaminergic neurons in mice for a long time, thus regulating movement.

**[KEY WORDS]** Ghrelin; Gene knockout techniques; Substantia nigra; Dopaminergic neurons; Long-term potentiation; Receptors, ionotropic glutamate

胃饥饿素(*ghrelin*)是一种胃底 X/A 样细胞分

泌的含 28 个氨基酸的脑肠肽,是生长激素促分泌素受体 1a(GHS-R1a)的内源性配体,可刺激人和动物生长激素的分泌<sup>[1-4]</sup>。Ghrelin 在机体中发挥着重要的生理学功能,如刺激肠道蠕动、调节压力和焦虑、

[收稿日期] 2023-12-27; [修订日期] 2024-04-02

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(32371181)

[通讯作者] 杜希恂, Email: xunxundu@163.com

防止肌肉萎缩以及改善心血管功能等<sup>[5-7]</sup>。本实验室前期研究发现,外源性 ghrelin 可通过激活 GHS-R1a 介导的信号转导通路,拮抗神经毒素 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)诱导的小鼠黑质多巴胺能神经元损伤,发挥神经保护作用<sup>[8-11]</sup>。Ghrelin 通过调节中枢神经回路,如下丘脑、腹侧被盖和海马回路的突触可塑性,使机体对摄食、药物成瘾、学习记忆等方面做出反应<sup>[12]</sup>。本研究拟选用雄性野生型(WT)小鼠和雄性 ghrelin 基因敲除小鼠,对其黑质进行转录组学测序(RNA-seq),筛选差异表达基因(DEGs),通过 KEGG 通路富集分析 DEGs 可能参与的神经元突触活动相关信号通路,并验证富集在神经元突触活动通路上的相关基因以及蛋白在黑质中的表达情况,探讨 ghrelin 对小鼠黑质多巴胺能神经元突触活动的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

TRIzol、RT SuperMix for qPCR、SYBR qPCR 预混液购买于南京诺唯赞生物科技股份有限公司,BCA 蛋白定量试剂盒购买于北京康为世纪有限公司,GSK-3 $\beta$  抗体购自杭州华安生物技术有限公司,GluA3 抗体购自武汉爱博泰克生物公司,ECL 发光液购自德国 Millipore 公司,UVP BioDoc-It 成像系统购自美国 Upland 公司,SDS-PAGE 垂直凝胶电泳槽、S1000 PCR 仪、CFX96TM Real-Time System 购自美国 BIO-RAD 公司。

### 1.2 实验动物与分组

10 周龄的雄性 ghrelin 基因敲除小鼠(ghrelin<sup>-/-</sup>组)11 只及同窝雄性 WT 小鼠(WT 组)11 只均由江苏集萃药康生物公司提供。所有小鼠在室温(24 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C,湿度为(55 $\pm$ 5)%条件下饲养,自由进食饮水。

### 1.3 方法

**1.3.1 黑质组织的提取及 RNA-seq 分析** 所有 ghrelin<sup>-/-</sup>组和 WT 组小鼠麻醉后,迅速断头处死,取出脑组织,置于干冰中速冻 3 min,剥离双侧黑质组织并置于标记好的 EP 管中,-80 $^{\circ}$ C 保存。每组随机选取 6 只小鼠的双侧黑质组织用于测序。测序样本低温运输至北京诺禾致源生物有限公司进行 RNA-seq 分析。

**1.3.2 DEGs 筛选** 采用标准方法提取 WT 组和 ghrelin<sup>-/-</sup>组小鼠脑组织中 RNA,采用 Subread 软件对基因表达水平进行定量分析,筛选两组小鼠黑

质组织的 DEGs,筛选条件为  $P < 0.05$ 。

**1.3.3 KEGG 通路富集分析** 采用 Cluster Profiler 软件对 DEGs 进行 KEGG 通路富集分析,以  $P < 0.05$  为显著富集, $P$  值越小表示富集越显著,选取  $P$  值较小且参与突触电活动通路的基因,用于后续小鼠的验证。

**1.3.4 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)方法检测小鼠黑质区  $\alpha$ -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异噁唑丙酸型亚基 3(GluA3)、糖原合酶激酶-3 $\beta$ (GSK-3 $\beta$ ) mRNA 的水平** 将两组小鼠剩余的双侧黑质组织(每组各 5 只),取其一侧的全部黑质组织置于 500  $\mu$ L TRIzol 中,应用 TRIzol 法提取组织总 RNA。以样本中提取的 mRNA 为模板,在逆转录酶的作用下,合成互补的 cDNA。配置 PCR 反应体系,经过 40 个循环完成扩增。引物由北京擎科生物股份有限公司合成,引物名称及其序列见表 1。采用 SYBR 法定量检测目的基因 GluA3、GSK-3 $\beta$  以及内参基因 GAPDH 的表达水平,根据  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法计算目的基因的相对表达水平。

表 1 引物名称及其序列

名称	序列	长度(bp)
GSK-3 $\beta$	F:5'-TGGCAGCAAGGTAACCCACAG-3'	20
	R:5'-CGGTTCTTAAATCGCTTGTCTG-3'	23
GluA3	F:5'-ACCATCAGCATAGGTGGACTT-3'	21
	R:5'-ACGTGGTAGTTCAAATGGAAGG-3'	22
GAPDH	F:5'-ATCACTGCCACCCAGAAG-3'	18
	R:5'-TCCACGACGGACACATTG-3'	18

**1.3.5 Western blotting 法检测小鼠黑质区 GluA3、GSK-3 $\beta$  蛋白的表达水平** 取两组小鼠剩余的另外一侧黑质组织,加入 100  $\mu$ L 蛋白裂解液(蛋白磷酸酶抑制剂:蛋白酶抑制剂:RIPA 强裂解液=1:2:100)充分研磨以后,冰上静置 30 min,4 $^{\circ}$ C 下 12 000 r/min 离心 20 min。上清液移至新 EP 管中,BCA 法测定蛋白浓度。蛋白经 SDS-PAGE 电泳(浓缩胶电泳参数为恒压 80 V,分离胶电泳参数为恒压 120 V)后湿转至 PVDF 膜上,将膜从湿转盒中取出,加入 TBST 配置的 10% 脱脂奶粉中,室温孵育 2 h。再分别加入 GluA3(1:1 000)、GSK-3 $\beta$ (1:1 000)和 GAPDH(1:10 000)一抗,4 $^{\circ}$ C 下于摇床上过夜。将 HRP 偶联的二抗用 TBST 按照 1:10 000 比例进行稀释,室温下孵育 2 h。用 UVP BioDoc-It 成像系统以及 ECL 高灵敏化学发光液试剂盒显影,并采用 Image J 软件进行灰度值分析,GluA3、GSK-3 $\beta$  蛋白相对表达量以 GluA3、GSK-3 $\beta$

蛋白灰度值/GAPDH 蛋白灰度值表示。

## 2 结 果

### 2.1 数据质量评估

12 只小鼠的测序错误率均低于 12.5%，GC 含量分布稳定，WT 组与 ghrelin<sup>-/-</sup> 组间基因表达量的 Pearson 相关系数均大于 0.93，说明数据的可靠性高，基因相似性高，可进行后续分析。

### 2.2 两组小鼠黑质组织中 DEGs 分析

WT 组与 ghrelin<sup>-/-</sup> 组间共有 2 355 个 DEGs，其中 1 655 个基因在 WT 组呈现高表达，700 个基因在 ghrelin<sup>-/-</sup> 组呈现高表达。

### 2.3 两组小鼠黑质组织中 DEGs 的 KEGG 通路富集分析

KEGG 通路富集分析结果显示，有 23 个 DEGs 富集到多巴胺能突触信号通路上，与 WT 组相比，ghrelin<sup>-/-</sup> 组中表达上调的基因有 5 个，分别为原癌基因(*Fos*)、G 蛋白亚基  $\gamma 3$ (*Gng3*)、蛋白磷酸酶 1 催化亚基  $\alpha$ (*Ppp1ca*) 以及蛋白磷酸酶 2 催化亚基(*Ppp2r3a*, *Ppp2r5e*)；表达下调的基因有 18 个，有多巴胺受体的 D3 亚型(*Drd3*)、钠电压门控通道  $\alpha$  亚基 1(*Scn1a*)、糖原合酶激酶  $3\beta$ (*GSK-3\beta*)、cAMP 反应元件结合蛋白 1(*Creb1*)、谷氨酸离子型受体 AMPA 型亚基(*GluA3*, *GluA4*)、NMDA 受体 NR2 亚基(*Grin2b*, *Grin2a*)、钙电压门控通道亚基(*Cacna1a*, *Cacna1d*)、丝氨酸/苏氨酸激酶 3(*Akt3*) 等。其中 *GluA3* 和 *GSK-3\beta* 分别调节  $\alpha$ -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异噁唑丙酸受体 (AMPA) 和 N-甲基-D-天冬氨酸受体 (NMDAR) 的活性，在突触传递过程中发挥着重要的生理功能。

### 2.4 Ghrelin 基因敲除对小鼠黑质组织中 GluA3、GSK-3 $\beta$ mRNA 表达的影响

RT-qPCR 结果显示，WT 组小鼠黑质组织中 *GluA3* mRNA 水平为  $1.129 \pm 0.230$ ，ghrelin<sup>-/-</sup> 组为  $0.552 \pm 0.068$ ，两组比较差异具有显著意义 ( $t = 2.408, P < 0.05$ )；WT 组小鼠黑质组织中 *GSK-3\beta* mRNA 的水平为  $1.257 \pm 0.121$ ，ghrelin<sup>-/-</sup> 组则为  $0.921 \pm 0.089$ ，两组比较差异具有显著性 ( $t = 2.740, P < 0.05$ )。

### 2.5 Ghrelin 基因敲除对小鼠黑质组织中 GluA3、GSK-3 $\beta$ 蛋白表达的影响

WT 组小鼠黑质组织中 *GluA3* 蛋白表达水平为  $0.141 \pm 0.012$ ，ghrelin<sup>-/-</sup> 组为  $0.290 \pm 0.058$ ，两组比较差异具有显著性 ( $t = 2.530, P < 0.05$ )；WT

组小鼠的黑质组织中 *GSK-3\beta* 蛋白的表达水平为  $0.670 \pm 0.056$ ，ghrelin<sup>-/-</sup> 组为  $0.422 \pm 0.040$ ，两组比较差异具有显著性 ( $t = 3.469, P < 0.05$ )。见图 1。

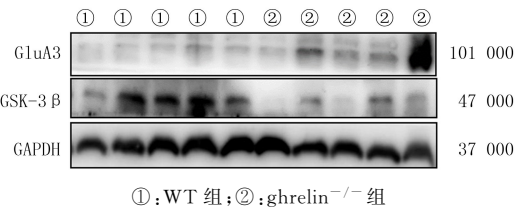


图 1 两组小鼠黑质组织中 *GluA3*、*GSK-3\beta* 蛋白表达水平

## 3 讨 论

突触后电位持续增强或减弱的现象称为长时程增强 (LTP) 或长时程抑制 (LTD)，LTP 和 LTD 的改变都会导致神经系统疾病的发生，如帕金森病、阿尔茨海默病、神经性疼痛、抑郁症等<sup>[13]</sup>。在中枢神经系统中，兴奋性神经传递主要是由谷氨酸及其离子型受体介导的，包括介导中枢神经系统快速兴奋性突触传递的 AMPAR 和维持长期突触可塑性的 NMDAR。在哺乳动物中，AMPA 主要负责大脑中的兴奋性突触传递，由成孔亚基 *GluA1*~*GluA4* 的各种组合形式组成<sup>[14-16]</sup>。在小鼠海马 CA1 锥体神经元中，表达有 *GluA3* 亚基的 AMPAR 存在于突触和细胞表面，基础条件下，*GluA3* 处于低电导状态，当细胞内 cAMP 水平升高时，*GluA3* 介导的电流会显著增加<sup>[14]</sup>。AMPA 激活后，*GluA3* 亚基能引起大量的  $\text{Na}^+$  和  $\text{Ca}^{2+}$  由胞外流到胞内，从而介导中枢神经系统的兴奋性突触传递。研究表明，创伤性脑损伤后小鼠海马区 *GluA3* 的表达水平上调，该蛋白的上调能够引起神经元损伤以及学习和记忆功能的下降甚至丧失<sup>[17]</sup>。本研究结果显示，与 WT 组小鼠相比，ghrelin<sup>-/-</sup> 组小鼠黑质组织中 *GluA3* 的 mRNA 水平降低，但是 *GluA3* 蛋白表达水平显著升高，这种现象通常称为 mRNA 和蛋白质水平之间的解偶联。翻译和翻译后修饰以及 mRNA 结合蛋白和非编码 RNA 都可导致 mRNA 和蛋白质表达水平的差异，另外蛋白降解的途径被抑制也会导致这一现象<sup>[18-19]</sup>。而上调的 *GluA3* 蛋白通过引起突触后膜  $\text{Na}^+$  和  $\text{Ca}^{2+}$  的内流，从而引发兴奋性突触传递<sup>[17,20]</sup>。

*GSK-3* 是一种丝氨酸苏氨酸蛋白激酶，通过磷酸化调节糖原合酶的活性，在中枢神经系统中大量表达。该酶具有两种形式，即 *GSK-3\alpha* 和 *GSK-3\beta*，体内研究表明 *GSK-3\alpha* 基因缺失对小鼠胚胎存活没有显著影响，但 *GSK-3\beta* 的完全敲除能够引发小鼠

胚胎死亡<sup>[21]</sup>。GSK-3 $\beta$  功能异常与各种疾病有关,包括阿尔茨海默病、抑郁症、双相情感障碍和药物成瘾等。因此,GSK-3 $\beta$  被认为是多种脑部疾病的主要治疗靶点。该激酶被证实可参与 NMDAR 依赖性 LTP 和 LTD 的调节。研究表明,GSK-3 抑制剂能够阻止大鼠海马 CA1 神经元 LTD 的诱导,且可挽救因 GSK-3 $\beta$  过表达而引起的 LTP 损伤。因此 GSK-3 $\beta$  是诱导大鼠海马 CA1 神经元 LTD 所必需的,在 LTD 期间被激活<sup>[22]</sup>;大鼠海马中的 LTP 被诱导以后,GSK-3 $\beta$  受到抑制<sup>[23-24]</sup>。在本研究中,与 WT 组小鼠相比,ghrelin<sup>-/-</sup> 组小鼠黑质中 GSK-3 $\beta$  mRNA 和蛋白表达水平均明显降低,这进一步提示 ghrelin 敲除后,可能会引起小鼠 NMDAR 依赖性 LTP 增加。

综上所述,在 ghrelin 基因敲除小鼠中,中脑黑质区 GluA3 蛋白表达水平增加,GSK-3 $\beta$  蛋白表达水平降低,这可能会引起多巴胺能神经元 AMPAR 以及 NMDAR 介导的 LTP 的发生,从而增强兴奋性突触传递活动。本研究结果为 ghrelin 在神经元突触调控中的研究提供了一定的实验依据。

**伦理批准和动物权利声明:**本研究涉及的所有动物实验均已通过青岛大学医学伦理委员会的审核批准(文件号 QDU-AEC-2023135)。所有实验过程均遵照《青岛大学实验动物操作标准》的条例进行。

**作者声明:**刘静、杜希恂、李焕焕、焦倩、陈曦、姜宏参与了研究设计;刘静、杜希恂参与了论文的写作和修改。所有作者均阅读并同意发表该论文,且均声明不存在利益冲突。

### [参考文献]

- EVERARD M J, MACAULAY V M, MILLAR J L, et al. D-Arg1, D-Phe5, D-Trp7, 9, Leu11] substance P inhibits the growth of human small cell lung cancer xenografts in vivo[J]. Eur J Cancer, 1993,29A(10):1450-1453.
- CAMINA J P, CARREIRA M C, MESSARI S E, et al. Desensitization and endocytosis mechanisms of ghrelin-activated growth hormone secretagogue receptor 1a[J]. Endocrinology, 2004,145(2):930-940.
- RINGUET M T, FURNESS J B, FURNESS S G B. G protein-coupled receptor interactions and modification of signalling involving the ghrelin receptor, GHSR1a[J]. J Neuroendocrinol, 2022,34(9):e13077.
- KOJIMA M, HOSODA H, DATE Y, et al. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach[J]. Nature, 1999,402(6762):656-660.
- MULLER T D, NOGUEIRAS R, ANDERMANN M L, et al. Ghrelin[J]. Mol Metab, 2015,4(6):437-460.
- WANG L, CHEN Q W, LI G Q, et al. Ghrelin stimulates angiogenesis via GHSR1a-dependent MEK/ERK and PI3K/Akt signal pathways in rat cardiac microvascular endothelial cells[J]. Peptides, 2012,33(1):92-100.
- CORDIDO F, ISIDRO M L, NEMINA R, et al. Ghrelin and growth hormone secretagogues, physiological and pharmacological aspect[J]. Curr Drug Discov Technol, 2009,6(1):34-42.
- JIANG H, LI L J, WANG J, et al. Ghrelin antagonizes MPTP-induced neurotoxicity to the dopaminergic neurons in mouse substantia nigra[J]. Exp Neurol, 2008,212(2):532-537.
- DONG J J, SONG N, XIE J X, et al. Ghrelin antagonized 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>)-induced apoptosis in MES23.5 cells[J]. J Mol Neurosci, 2009,37(2):182-189.
- SHI L M, BIAN X L, QU Z Q, et al. Peptide hormone ghrelin enhances neuronal excitability by inhibition of Kv7/KCNQ channels[J]. Nat Commun, 2013,4:1435.
- LIU L, XU H M, JIANG H, et al. Ghrelin prevents 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced cytotoxicity through antioxidant and NF- $\kappa$ B modulation in MES23.5 cells[J]. Exp Neurol, 2010,222(1):25-29.
- SERRENHO D, SANTOS S D, CARVALHO A L. The role of ghrelin in regulating synaptic function and plasticity of feeding-associated circuits[J]. Front Cell Neurosci, 2019,13:205.
- ROWAN M J, KLYUBIN I, CULLEN W K, et al. Synaptic plasticity in animal models of early Alzheimer's disease[J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2003,358(1432):821-828.
- RENNER M C, ALBERS E H, GUTIERREZ-CASTELLANOS N, et al. Synaptic plasticity through activation of GluA3-containing AMPA-receptors[J]. Elife, 2017,6:e25462.
- ITALIA M, FERRARI E, LUCA M D, et al. GluA3-containing AMPA receptors: From physiology to synaptic dysfunction in brain disorders[J]. Neurobiol Dis, 2021,161:105539.
- JACOB A L, WEINBERG R J. The organization of AMPA receptor subunits at the postsynaptic membrane[J]. Hippocampus, 2015,25(7):798-812.
- NIU F, ZHANG B, FENG J, et al. Protein profiling identified mitochondrial dysfunction and synaptic abnormalities after dexamethasone intervention in rats with traumatic brain injury[J]. Neural Regen Res, 2021,16(12):2438-2445.
- YU X M, LIU Y, JIN T, et al. The expression of SIRT1 and DBC1 in laryngeal and hypopharyngeal carcinomas[J]. PLoS One, 2013,8(6):e66975.
- RUSSO I, BONINI D, VIA L L, et al. AMPA receptor properties are modulated in the early stages following pilocarpine-induced status epilepticus[J]. Neuromolecular Med, 2013,15(2):324-338.
- GUTIERREZ-CASTELLANOS N, DA SILVA-MATOS C M, ZHOU K K, et al. Motor learning requires Purkinje cell synaptic potentiation through activation of AMPA-receptor subunit GluA3[J]. Neuron, 2017,93(2):409-424.

- tivation protein- $\alpha$  and heme oxygenase-1[J]. *Cancer Immunol Res*, 2014,2(2):121-126.
- [6] MULIADITAN T, CARON J, OKESOLA M, et al. Macrophages are exploited from an innate wound healing response to facilitate cancer metastasis[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1):2951.
- [7] SHEN C Q, LIU J, JIAO W, et al. A feed-forward loop based on aerobic glycolysis and TGF- $\beta$  between tumor-associated macrophages and bladder cancer cells promoted malignant progression and immune escape[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2023,149(14):12867-12880.
- [8] ZHANG Z, YU Y B, ZHANG Z L, et al. Cancer-associated fibroblasts-derived CXCL12 enhances immune escape of bladder cancer through inhibiting P62-mediated autophagic degradation of PDL1[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2023,42(1):316.
- [9] TANG P C, CHUNG J Y, XUE V W, et al. Smad3 promotes cancer-associated fibroblasts generation via macrophage-myofibroblast transition[J]. *Adv Sci*, 2022,9(1):e2101235.
- [10] BINNEWIES M, ROBERTS E W, KERSTEN K, et al. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy[J]. *Nat Med*, 2018,24(5):541-550.
- [11] DASARI S, FANG Y M, MITRA A K. Cancer associated fibroblasts: Naughty neighbors that drive ovarian cancer progression[J]. *Cancers*, 2018,10(11):406.
- [12] TAO L L, HUANG G C, SONG H Z, et al. Cancer associated fibroblasts: An essential role in the tumor microenvironment [J]. *Oncol Lett*, 2017,14(3):2611-2620.
- [13] CHEN X M, SONG E W. Turning foes to friends: Targeting cancer-associated fibroblasts[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, 18(2):99-115.
- [14] LAVIE D, BEN-SHMUEL A, EREZ N, et al. Cancer-associated fibroblasts in the single-cell era[J]. *Nat Cancer*, 2022,3(7):793-807.
- [15] RIMAL R, DESAI P, DAWARE R, et al. Cancer-associated fibroblasts: Origin, function, imaging, and therapeutic targeting[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2022,189:114504.
- [16] KILVAER T K, KHANEHKNARI M R, HELLEVIK T, et al. Cancer associated fibroblasts in stage I – III A NSCLC: Prognostic impact and their correlations with tumor molecular markers[J]. *PLoS One*, 2015,10(8):e0134965.
- [17] CORONA A, BLOBE G C. The role of the extracellular matrix protein TGFBI in cancer [J]. *Cell Signal*, 2021, 84:110028.
- [18] MAO X Q, XU J, WANG W, et al. Crosstalk between cancer-associated fibroblasts and immune cells in the tumor microenvironment: New findings and future perspectives[J]. *Mol Cancer*, 2021,20(1):131.
- [19] DERYUGINA E I, QUIGLEY J P. Tumor angiogenesis: MMP-mediated induction of intravasation- and metastasis-sustaining neovasculature[J]. *Matrix Biol*, 2015,44-46:94-112.
- [20] RÄSÄNEN K, VAHERI A. Activation of fibroblasts in cancer stroma[J]. *Exp Cell Res*, 2010,316(17):2713-2722.
- [21] CHEN J Z, TANG Y, ZHONG Y, et al. P2Y12 inhibitor clopidogrel inhibits renal fibrosis by blocking macrophage-to-myofibroblast transition[J]. *Mol Ther*, 2022, 30(9):3017-3033.
- [22] LEBLEU V S, TADURI G, O'CONNELL J, et al. Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis[J]. *Nat Med*, 2013,19(8):1047-1053.
- [23] ZHOU Y Y, LI Z L, YU S Y, et al. Igaratimod prevents renal fibrosis in unilateral ureteral obstruction model mice by suppressing M2 macrophage infiltration and macrophage-myofibroblast transition[J]. *Ren Fail*, 2024,46(1):2327498.
- [24] ZHAO X X, DING L, LU Z Y, et al. Diminished CD68<sup>+</sup> cancer-associated fibroblast subset induces regulatory T-cell (treg) infiltration and predicts poor prognosis of oral squamous cell carcinoma patients[J]. *Am J Pathol*, 2020,190(4):886-899.
- [25] SEMENZA G L. Cancer-stromal cell interactions mediated by hypoxia-inducible factors promote angiogenesis, lymphangiogenesis, and metastasis[J]. *Oncogene*, 2013,32(35):4057-4063.
- [26] GARRISON G, HUANG S K, OKUNISHI K, et al. Reversal of myofibroblast differentiation by prostaglandin E(2)[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2013,48(5):550-558.
- [27] BATLLE E, MASSAGUÉ J. Transforming growth factor- $\beta$  signaling in immunity and cancer[J]. *Immunity*, 2019,50(4):924-940.
- [28] BIFFI G, TUVESON D A. Diversity and biology of cancer-associated fibroblasts[J]. *Physiol Rev*, 2021,101(1):147-176.
- (本文编辑 耿波)
- (上接第 202 页)
- [21] LAURETTI E, DINCER O, PRATICO D. Glycogen synthase kinase-3 signaling in Alzheimer's disease[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2020,1867(5):118664.
- [22] PEINEAU S, BRADLEY C, TAGHIBIGLOU C, et al. The role of GSK-3 in synaptic plasticity[J]. *Br J Pharmacol*, 2008, 153(Suppl 1):S428-S437.
- [23] TAO W W, YAO G D, YUE Q Y, et al. 14-3-3 $\zeta$  Plays a key role in the modulation of neuroplasticity underlying the antidepressant-like effects of Zhi-Zi-Chi-Tang [J]. *Phytomedicine*, 2023,116:154888.
- [24] CASTANO A, SILVESTRE M, WELLS C I, et al. Discovery and characterization of a specific inhibitor of serine-threonine kinase cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5) demonstrates role in hippocampal CA1 physiology [J]. *Elife*, 2023, 12:e88206.
- (本文编辑 耿波)