

• 基础研究 •

## Bmi-1 基因杂合子缺失对小鼠脑老化的影响

何晓鑫<sup>1</sup>, 高俊英<sup>1</sup>, 郭吉超<sup>1,2\*</sup>, 肖明<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>南京医科大学江苏省神经退行性疾病重点实验室, 江苏 南京 211166; <sup>2</sup>青岛滨海学院医学院基础医学教研室, 山东 青岛 266500

**[摘要]** 目的: Bmi-1 (B-cell specific moloney leukemia virus insertion site 1) 基因在干细胞增殖和分化中的作用已有大量文献报道, 但其在老年小鼠脑中发挥的作用尚不清楚。本研究旨在探讨 Bmi-1 在脑衰老中的病理生理作用。方法: 选取 17 月龄的 Bmi-1 杂合子 (Bmi-1<sup>+/-</sup>) 小鼠和野生型 (wild-type, WT) 小鼠, 采用行为学检测、免疫组化及 Masson 染色等技术, 比较 Bmi-1<sup>+/-</sup> 小鼠和 WT 小鼠的整体健康状况及长期记忆能力; 通过 HE 染色、电子显微镜及 Western blot 等方法, 研究 Bmi-1 基因半剂量敲除对小鼠脑衰老进程的潜在影响。结果: Bmi-1<sup>+/-</sup> 小鼠较同窝 WT 小鼠出现了长期空间记忆功能的减弱 ( $P < 0.05$ ), 伴随着海马齿状回 (dentate gyrus, DG) 区域特异性的神经细胞发生减少 ( $P < 0.05$ ), 神经元数目降低 ( $P < 0.05$ ) 和灰质区体积缩小 ( $P < 0.05$ )。进一步研究发现, 与 WT 小鼠相比, Bmi-1<sup>+/-</sup> 小鼠 DG 区神经元线粒体膨大、肿胀, 线粒体嵴减少的比例增加 ( $P < 0.05$ ), 且 DG 区神经元细胞质中脂褐素的数量明显增加 ( $P < 0.05$ ); 此外, Bmi-1<sup>+/-</sup> 小鼠 DG 区神经元线粒体能量代谢相关蛋白泛醌氧化还原酶核心亚基 V2 [NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 2, NDUFV2] 和泛醌氧化还原酶核心亚基 S3 [NADH dehydrogenase (ubiquinone) ferrithionein 3, NDUFS3] 的表达量均下调 ( $P < 0.05$ ), 三羧酸循环的重要催化酶二氢硫辛酰琥珀酰转移酶蛋白 (dihydrolypoyl S-succinyltransferase, DLST) 也显著下调 ( $P < 0.01$ ); 同时 Bmi-1 调控的细胞周期因子中, 细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 p27 和肿瘤蛋白 p53 显著上调 ( $P < 0.05$ )。结论: Bmi-1 基因的半剂量缺失抑制了老龄鼠脑内海马区新生神经元的产生, 导致海马 DG 区体积的特异性缩小, 长期记忆功能障碍, 其机制可能与老化相关蛋白 p27、p53 表达异常和神经元线粒体变性有关。

**[关键词]** Bmi-1; 脑衰老; 线粒体; 细胞增殖; 氧化应激

**[中图分类号]** R338

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2024)11-1473-11

**doi:** 10.7655/NYDXBNSN240836

## Effects of heterozygous deletion of Bmi-1 gene on the mouse brain aging

HE Xiaoxin<sup>1</sup>, GAO Junying<sup>1</sup>, GUO Jichao<sup>1,2\*</sup>, XIAO Ming<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Jiangsu Key Laboratory of Neurodegeneration, Nanjing Medical University, Nanjing 211166; <sup>2</sup>Department of Basic Medicine, School of Medicine, Qingdao Binhai University, Qingdao 266500, China

**[Abstract]** **Objective:** B-cell specific moloney leukemia virus insertion site 1 (Bmi-1) has been extensively documented for its role in stem cell proliferation and differentiation, but its role in the brain of aged mice remains unclear. The study aimed to investigate the pathophysiological role of Bmi-1 in brain aging. **Methods:** Seventeen-month-old Bmi-1 heterozygous (Bmi-1<sup>+/-</sup>) mice and wild-type (WT) mice were selected as experimental subjects. Behavioral testing, immunohistochemistry, and Masson staining techniques were used to compare the overall health status and long-term memory abilities of Bmi-1<sup>+/-</sup> mice with WT mice. HE staining, electron microscopy, and Western blot were employed to investigate the potential effects of Bmi-1 gene haploinsufficiency on the brain aging in mice. **Results:** Compared with the WT mice, Bmi-1<sup>+/-</sup> mice showed a diminished long-term spatial memory function ( $P < 0.05$ ), accompanied by a reduction in neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus (DG,  $P < 0.05$ ), a decrease in neuronal numbers ( $P < 0.05$ ), and a reduction in the grey matter volume ( $P < 0.05$ ). Further studies revealed that compared with the WT mice, Bmi-1<sup>+/-</sup> mice exhibited enlarged and swollen mitochondria in DG neurons, with an increased proportion of reduced mitochondrial cristae ( $P < 0.05$ ), and a significant increase in the number of lipofuscin in the cytoplasm of DG neurons ( $P < 0.05$ ). Additionally, the expression levels of mitochondrial energy metabolism-related proteins, such as NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 2 (NDUFV2) and NADH

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81271210)

\*通信作者 (Corresponding author), E-mail: jichaoguo0809@163.com; mingx@njmu.edu.cn

dehydrogenase(ubiquinone)ferrithionein 3(NDUFS3), were down-regulated in the DG region of Bmi-1<sup>+/-</sup> mice ( $P < 0.05$ ), and the key catalytic enzyme dihydrolipoyl S-succinyltransferase (DLST) in the tricarboxylic acid cycle was also significantly down-regulated ( $P < 0.01$ ). Meanwhile, among the cell cycle factors regulated by Bmi-1, the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 and oncoprotein p53 were significantly up-regulated ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Half dose deletion of the Bmi-1 gene inhibits the generation of new neurons in the hippocampal region of aged mice, leading to a specific reduction in the volume of the hippocampal DG region and impairments in long-term memory function. The underlying mechanism may be related to the abnormal expression of aging-related proteins p27 and p53, as well as neuronal mitochondrial degeneration.

[Key words] Bmi-1; brain aging; mitochondria; cell proliferation; oxidative stress

[J Nanjing Med Univ, 2024, 44(11): 1473-1482, 1516]

衰老过程中出现的学习和记忆相关的脑功能障碍是阿尔茨海默病的早期症状,探索其内在机制将有助于防治脑衰老及相关疾病<sup>[1]</sup>。

Bmi-1(B-cell specific moloney leukemia virus insertion site 1)是多梳基因家族的一员,可负性调控细胞周期蛋白相关蛋白p16<sup>Ink4a</sup>和p19<sup>Arf</sup>的表达,从而控制细胞的增殖和衰老<sup>[2]</sup>。此外,Bmi-1还具有调控线粒体功能和DNA损伤反应(DNA damage response, DDR)通路的作用从而影响细胞衰老<sup>[3-4]</sup>。

本课题组前期研究表明,Bmi-1基因敲除杂合子(heterozygous, Bmi-1<sup>+/-</sup>)小鼠成熟前发生神经退行性样病变,如神经元凋亡、突触变性、轴突脱髓鞘和反应性胶质细胞增生<sup>[5]</sup>;8月龄的Bmi-1<sup>+/-</sup>小鼠出现脑衰老相关的早期表型,包括轻度记忆下降、轻微的丙二醛(malondialdehyde, MDA)表达增加、脂褐素在神经元内沉积<sup>[6]</sup>。此外,Abdouh等<sup>[7]</sup>报道了老年人脑中Bmi-1的表达下调,提示Bmi-1可能参与正常的脑衰老进展。然而,Bmi-1基因在脑衰老中的作用和机制仍有待明确。

本研究通过观察分析17月龄的Bmi-1<sup>+/-</sup>和野生型(wild type, WT)同窝小鼠的认知功能、海马神经元的细胞结构、超微结构、神经发生和胶质细胞的激活,同时比较两种基因型小鼠细胞周期调节和线粒体功能相关蛋白的表达,以探索Bmi-1在脑衰老中的病理生理作用,为阐述脑衰老的机制及相关抗衰老靶点提供实验理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 动物

本研究中所用C57BL/6J背景Bmi-1<sup>+/-</sup>小鼠饲养于南京医科大学SPF级实验动物中心:12h:12h灯光/黑暗循环的可控照明,温度(18~22℃),湿度

(30%~50%),自由摄食、饮水。本实验已获得南京医科大学实验动物福利伦理委员会批准(SYXK-2015-0015)。

#### 1.1.2 试剂

β-actin抗体(CST公司,美国);Bmi-1、β-tubulin、双皮质素样激酶1(double cortin X, DCX)、p19、肿瘤蛋白p53、二氢硫辛酰胺脱氢酶(dihydrolipoamide dehydrogenase, DLD)、泛醌氧化还原酶核心亚基V2 [NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 2, NDUFV2]、泛醌氧化还原酶核心亚基S3 [NADH dehydrogenase (ubiquinone) ferrithionein 3, NDUFS3]、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂p27抗体、二氢硫辛琥珀酰转移酶蛋白(dihydrolipoyl S-succinyltransferase, DLST)、神经元细胞核(neuronal nuclei, Neun)抗体(Abcam公司,美国);半胱天冬蛋白酶3(cysteiny aspartate specific proteinase, Caspase - 3, CASP3)抗体(CST公司,美国);增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)抗体(Millipore公司,美国);兔二抗或小鼠二抗(Vector公司,美国)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 动物分组及模型建立

3~4月龄Bmi-1<sup>+/-</sup>雌、雄小鼠(由本校苗登顺教授馈赠)合笼后,所生的新生小鼠进行常规PCR鉴定出WT小鼠和Bmi-1<sup>+/-</sup>小鼠。断乳后,将2种基因型小鼠根据雌雄进行分笼饲养,至17月龄后分别进行行为学实验,并对其海马组织进行相关病理组织学和生化分析。同时选取3、10、16月龄的Bmi-1<sup>+/-</sup>小鼠和WT小鼠,检测其海马Bmi-1的蛋白表达水平。

### 1.2.2 Y迷宫

Y迷宫是一种用于研究啮齿类动物空间记忆能力的行为学实验<sup>[8]</sup>。该实验装置由起始臂、新奇臂和其他臂组成,呈字母“Y”的形状。通过比较小鼠进入新奇臂和其他臂的次数以及停留时间,评估小

鼠的短期空间记忆能力。实验包括适应阶段和测试阶段。在适应阶段,使用挡板将新奇臂与其他两臂隔开。将小鼠放入起始臂端,让其在起始臂和其他臂中自由活动,活动时间为5 min。适应阶段完成后,进入测试阶段。在测试阶段开始前,需移除挡板,使新奇臂与其他两臂连通。将小鼠依次从起始臂放入,在短期记忆正常的情况下,小鼠倾向于进入之前未曾进入的臂内即新奇臂,统计小鼠在其中穿越的总次数以及正确进入各臂的比例(以3次连续不重复进入各臂为正确的标准)。小鼠活动全程通过视频追踪软件进行记录和分析。

### 1.2.3 Morris 水迷宫

Morris 水迷宫测试是一种评估小鼠空间学习和记忆能力的行为学实验<sup>[9]</sup>,由一个圆形水池组成,内壁涂有黑色油漆,水温(22±2)℃,池壁经由西北、东北、东南、西南4个等距离点将水池划分为4个象限,在其中一象限内隐藏一直径10 cm的圆形白色平台,平台低于水面1 cm,池水中均匀撒入食用白色素并搅匀,使水池颜色变白。水池周围放置物品作为空间参照物,供小鼠定位平台位置,训练期间物品位置保持不变。实验包括①定位航行:用于检测小鼠学习和记忆的能力。训练时随机选择一个象限开始,按顺时针方向,将小鼠从各象限靠池壁的中点位置面向池壁轻轻放入水中,并观察记录在60 s内小鼠找到平台所需的时间,为逃避潜伏期。如果小鼠在60 s内未能找到隐藏的平台,则需人为引至平台上,停留10 s,助其记忆,此时潜伏期记为60 s,小鼠游泳速度需同时记录并分析。每个象限训练1次,每天训练4次,连续训练6 d;②空间探索:用于检测小鼠在训练寻找平台后,对平台位置的空间记忆能力。第7天撤除平台,任选2个入水位置,不包括靶象限,将小鼠面向池壁轻轻放入水中,由正上方的摄像系统及电脑软件自动记录小鼠60 s内穿越平台的次数及靶象限运动时间百分比。

### 1.2.4 取材和切片制备

小鼠麻醉后于左心室快速推注37℃生理盐水约50 mL,小鼠皮肤、骨组织、脑组织股骨取材后置于装有4%多聚甲醛的EP管中,在4℃冰箱放置24 h,石蜡包埋切片,片厚5 μm,标记后备用,4℃保存。用于苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色及免疫组织化学染色。

### 1.2.5 股骨标本制作

部分动物取双侧股骨作为样本,将标本上的软组织剔除干净,放置在高碘酸盐-左旋赖氨酸-多

聚甲醛固定液中固定24 h,依次在含5%甘油的0.01 mmol/L PBS、含10%甘油的0.01 mmol/L PBS和含15%甘油的0.01 mmol/L PBS中浸泡12 h,即将标本转移至乙二胺四乙酸-甘油溶液(EDTA-glycerol, EDTA-G)溶液中脱钙10~14 d。脱钙后的标本依次在15 g蔗糖+92.5 mL的0.01 mmol/L的PBS+7.5 mL甘油、15 g蔗糖+100 mL的0.01 mmol/L的PBS和7.5 g蔗糖+100 mL的0.005 mmol/L的PBS中浸泡12 h。然后放置于0.01 mmol/L的PBS中4℃保存。固定好的骨组织经梯度酒精脱水并用二甲苯透明。石蜡包埋后切片,切片厚度为5 μm。对取材后的长骨组织采用南京医科大学动物中心动物X射线成像系统进行摄影。

### 1.2.6 HE 染色

石蜡切片脱蜡后使用苏木素染液浸泡15 min,流水冲洗10 min,滴加伊红染液1 min后再次流水冲洗10 min。随后进行梯度酒精脱水,最后使用中性树脂进行封片。

### 1.2.7 Masson 染色

石蜡切片脱蜡后使用Weigert铁苏木素染色5 min,流水冲洗10 min,随后使用1%酒精进行分化处理,流水冲洗直至返蓝,再使用丽春红酸性品红染色液染色5~10 min,流水冲洗10 min。使用磷钼酸水溶液处理5 min后使用苯胺蓝染液复染5 min。1%冰醋酸处理1 min,流水冲洗10 min。并进行梯度酒精脱水,最后使用中性树脂进行封片。

### 1.2.8 尼氏染色

石蜡切片脱蜡后使用0.5%尼氏染液,进行深度染色。随后使用去离子水和70%的酒精进行分色处理,持续20 s。并进行梯度酒精脱水,最后使用中性树脂进行封片。

### 1.2.9 免疫组织化学染色

对切片进行脱蜡和水化处理。随后加入以下抗体进行孵育:PCNA(1:1 000)、DCX(1:1 000)、Caspase-3(1:400)。在4℃下孵育过夜后,切片用PBS洗涤3次,每次5 min,再加入相应的兔二抗或鼠二抗(1:2 000)在37℃下孵育1 h。然后用PBS洗涤3次,每次5 min。最后,用DAB显影液进行显色,并进行脱水处理后进行封片。

### 1.2.10 蛋白印迹实验

提取小鼠脑组织样本中的总蛋白,上样至SDS凝胶上,电泳然后转移到PVDF膜上。用5%脱脂牛奶或TBST封闭1 h后,在4℃下与以下抗体分别进行孵育过夜:Bmi1(1:1 000)、p53(1:1 000)、p27

(1:500)、p19(1:1000)、 $\beta$ -tubulin(1:1000)、NDUFV2(1:500)、NDUFS3(1:500)、DLST(1:800)、DLG(1:500)、 $\beta$ -actin(1:1000)。第2天用TBST洗涤后,将膜与相应的二抗进行孵育。TBST清洗3次后加入ECL显影液曝光,通过Image J软件计算蛋白灰度值。

### 1.2.11 海马体积及免疫组化结果图像分析

应用立体计数法计数海马齿状回(dentate gyrus, DG)区体积,根据小鼠脑图谱,从海马出现的第1张片子开始收片,共收280张。计算每张片子DG区体积=面积 $\times$ 5  $\mu\text{m}$ ,则海马总体积为各张片子体积之和。使用Image J软件统计海马DG区神经元数量。免疫组化阳性面积及光密度分析采用Image-Pro软件进行统计。

### 1.3 统计学方法

用SPSS20.0软件进行统计学分析,数据用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,其中水迷宫定位航行实验结果进行重复双因素分析,其他结果应用Student's-*t*检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Bmi-1基因半剂量敲除不影响老龄小鼠的整体健康状况

研究表明,Bmi-1基因通过多种途径参与机体多系统、多器官的增殖、分化、凋亡等多条信号通路的调控,在生物体的不同阶段对其生长,发育,老化起到重要作用<sup>[10]</sup>。本研究观察了17月龄的Bmi-1<sup>+/-</sup>小鼠的外观和体重等一般性指标,发现与同窝WT小鼠相比,其外观正常,无明显的脱毛和皮肤损伤(图1A),两种基因型小鼠的体重差异无统计学意义( $P > 0.05$ ,图1B)。HE染色和Masson染色结果分别显示,两种基因类型的小鼠皮肤厚度和总的皮肤胶原蛋白含量的差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ,图1C~E)。此外,骨骼病理组织结果表明,两组小鼠骨骼形态结构完整,圆骨板结构正常(图1F)。骨骼生长板厚度没有变化,下层胶原纤维数量基本一致,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ,图1G、H)。X线显影骨骼结构分析发现,和WT小鼠比较,Bmi-1<sup>+/-</sup>小鼠四肢的长骨骨密度略有下降,但差异无统计学意义( $P > 0.05$ ,图1I、J),以上实验表明杂合子Bmi-1敲除并不影响老年小鼠的整体健康状况。

### 2.2 Bmi-1半剂量缺失导致老龄小鼠记忆受损

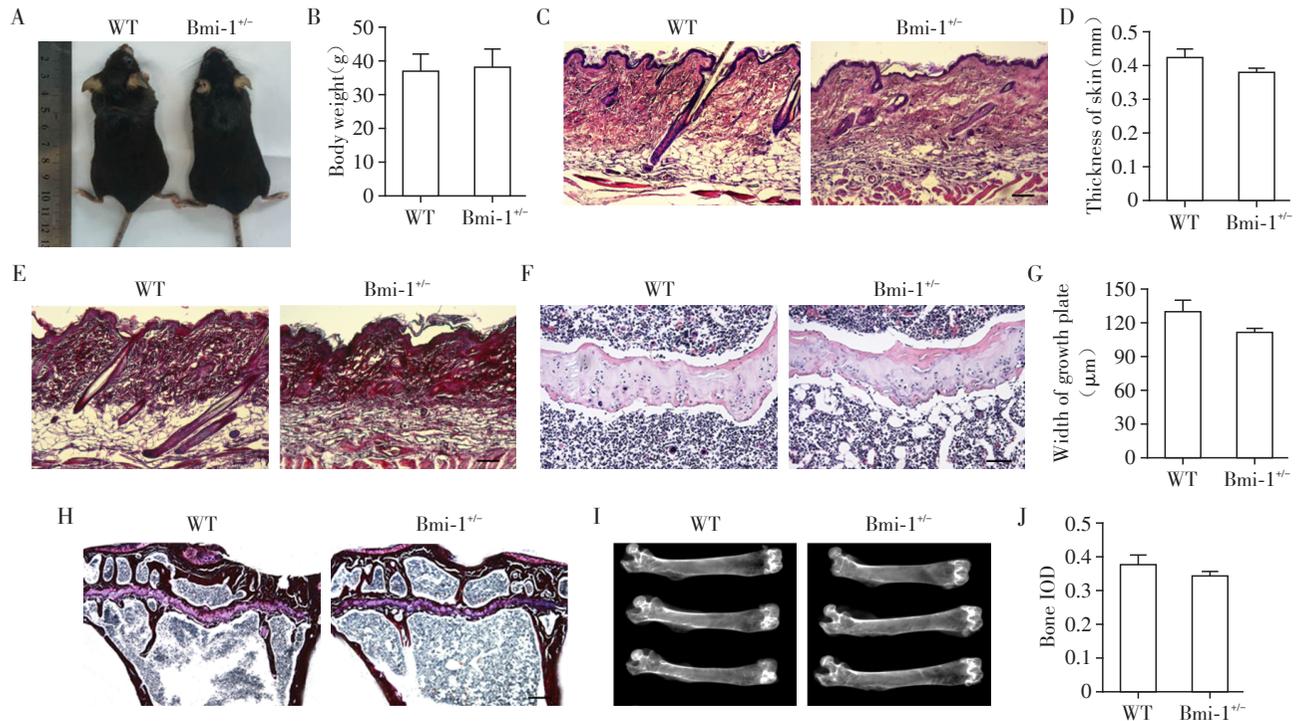
本研究采用Y迷宫实验检测Bmi-1基因半剂量敲除对小鼠短期空间记忆行为的影响。统计结果表

明,在正确进入各臂的比例上,Bmi-1<sup>+/-</sup>小鼠与WT小鼠间差异无统计学意义( $P > 0.05$ ,图2A),两者均能以高达60%左右的比例正确进入,说明有着很好的短期记忆力。另外,Bmi-1<sup>+/-</sup>小鼠相对WT小鼠穿越各臂总次数下降了近30%,但差异无统计学意义( $P > 0.05$ ,图2B),提示长期的Bmi-1半剂量缺失对老龄鼠短期记忆的减退存在着一定的个体差异性。

为探索Bmi-1基因半剂量敲除对小鼠长期空间记忆行为的影响,本研究进行了Morris水迷宫实验。为期2d的视觉平台测试结果显示,Bmi-1<sup>+/-</sup>小鼠在初次实验时能够很快找到目标象限,在时间上比WT小鼠缩短约30%,在第2天的测试中,2种小鼠所用时间均明显缩短,但Bmi-1<sup>+/-</sup>小鼠的所用时间仍然短于WT小鼠,这可能是由于其运动速度快于WT小鼠所致。2种小鼠在随后5d内找到隐藏平台的时间与在第1~3天的差异无统计学意义,但是在第4、5天,Bmi-1<sup>+/-</sup>小鼠所用时间显著长于WT小鼠( $P < 0.05$ ,图2C),两种小鼠寻找水下平台训练过程中运动速度均逐渐减慢,差异无统计学意义(图2D),表明Bmi-1<sup>+/-</sup>小鼠空间学习记忆能力较WT小鼠明显减弱。另外,Bmi-1<sup>+/-</sup>小鼠在目标象限停留时间和穿越平台次数上比WT小鼠均有明显减少( $P < 0.05$ ,图2E、F),提示其长期空间记忆能力下降。

### 2.3 半剂量敲除Bmi-1基因引起老龄小鼠DG体积和神经元数量减少

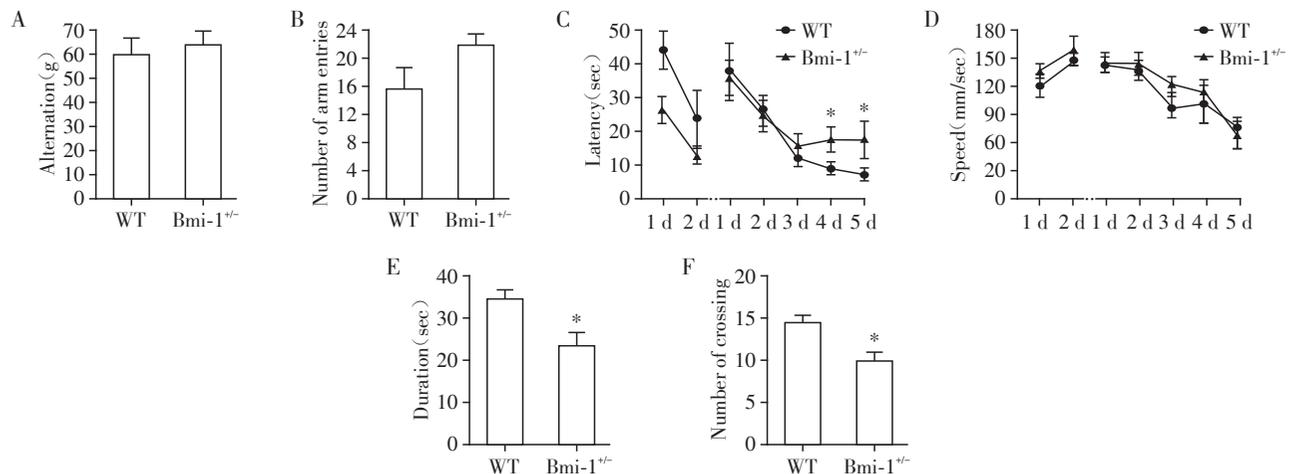
研究表明,空间学习记忆能力与海马体结构和功能的完整性密切相关<sup>[11]</sup>。为探讨Bmi-1<sup>+/-</sup>小鼠出现空间学习记忆能力下降的病理学基础,对小鼠海马区域进行连续切片,计算单张切片海马体积=海马面积 $\times$ 5  $\mu\text{m}$ ,将每张切片的海马体积相加得出海马的总体积。依此方法计算出海马各部分的体积(图3A)。结果显示,和WT小鼠相比,Bmi-1<sup>+/-</sup>小鼠海马总体积和CA1(cornu Ammonis, CA1)区体积差异均无统计学意义,但DG区体积明显缩小( $P < 0.05$ ,图3B),说明半剂量敲除Bmi-1基因可特异性诱导海马DG区体积萎缩。其中,Bmi-1<sup>+/-</sup>小鼠海马总灰质体积以及CA1区灰质体积较WT小鼠缩小,但差异无统计学意义,DG区的灰质体积显著小于WT小鼠( $P < 0.01$ ,图3C)。进一步统计海马各部分灰质体积在总体积中的占比,发现Bmi-1<sup>+/-</sup>小鼠DG区灰质体积占DG总体积的比例较WT小鼠明显下降( $P < 0.05$ ,图3D),提示Bmi-1基因半剂量敲除特异性地导致老年鼠DG灰质体积缩小。为进一步探究其原因,本研究使用神经元标志物Neun对神经元



A: Appearance of Bmi-1<sup>+/-</sup> and WT mice. B: Body weight of Bmi-1<sup>+/-</sup> and WT mice. C: HE staining of the skin showed cellular structures of Bmi-1<sup>+/-</sup> and WT mice. Scale bars=50 μm. D: The skin thickness of Bmi-1<sup>+/-</sup> and WT mice. E: Masson staining of the skin showed the distribution of total collagen in the skin of Bmi-1<sup>+/-</sup> and WT mice. Scale bars=50 μm. F: HE staining of long bones showing bone morphology and cellular architecture of Bmi-1<sup>+/-</sup> and WT mice. Scale bars=100 μm. G: Comparison of bone growth plate thicknesses between Bmi-1<sup>+/-</sup> and WT mice. H: Masson staining of long bones showing total collagen expression in bone of Bmi-1<sup>+/-</sup> and WT mice. Scale bars=200 μm. I: X-ray of long bones of Bmi-1<sup>+/-</sup> and WT mice. J: X-ray measurement of optical density in long bones of Bmi-1<sup>+/-</sup> and WT mice, showing the size of bone density (n=4).

图1 Bmi-1<sup>+/-</sup>小鼠与WT小鼠的体重、外貌、皮肤及骨骼分析比较

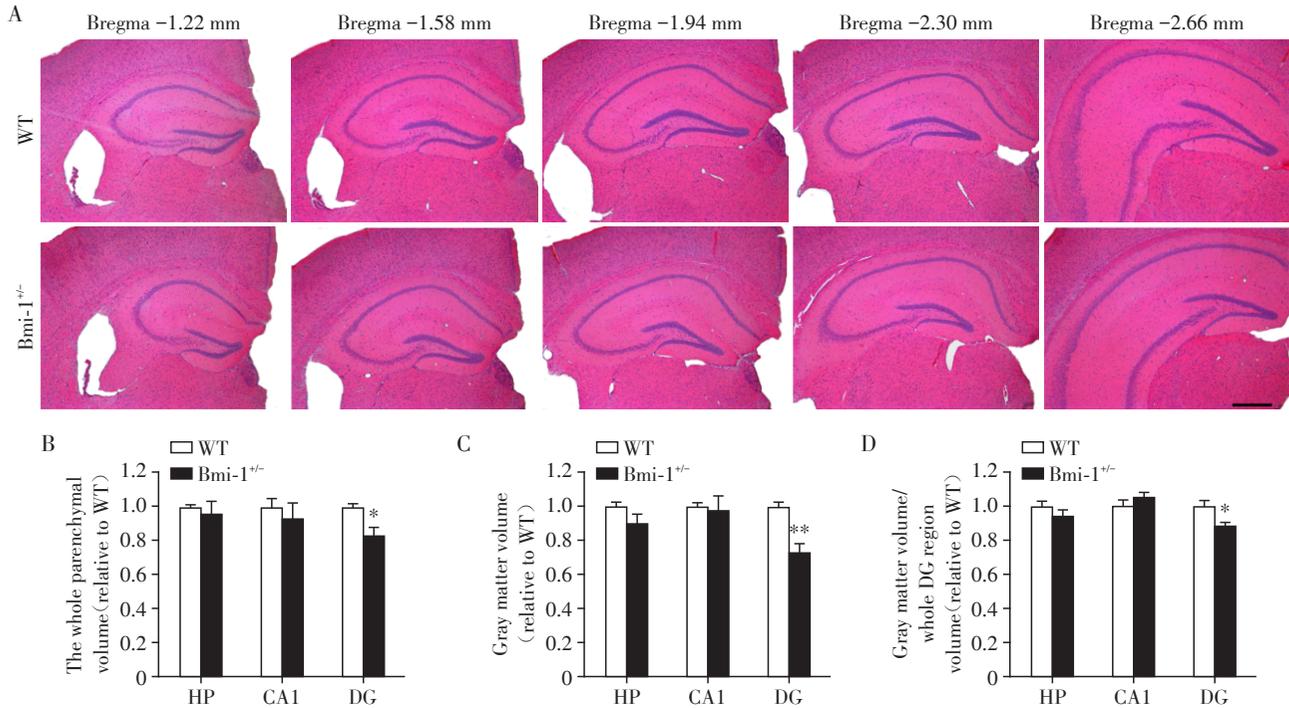
Figure 1 Comparisons of body weight, appearance, skin, and skeletal analysis between the Bmi-1<sup>+/-</sup> and WT mice



A: Comparison of the proportions of alternation in Y-maze test between the Bmi-1<sup>+/-</sup> mice and WT mice. B: Comparison of the number of arm entries between the Bmi-1<sup>+/-</sup> mice and WT mice. C: Comparison of the latency between the Bmi-1<sup>+/-</sup> mice and WT mice in finding target quadrant platform under both visual and non-visual platform condition. D: Comparison of the swimming speed between the Bmi-1<sup>+/-</sup> mice and WT mice. E: Comparison of the duration time between the Bmi-1<sup>+/-</sup> mice and WT mice in the target quadrant without platform at the next day after non-visual platform training. F: Comparison of the platform crossing times between the Bmi-1<sup>+/-</sup> mice and WT mice. Compared with the WT mice, \*P < 0.05 (n=7).

图2 Bmi-1<sup>+/-</sup>小鼠学习记忆行为学分析

Figure 2 Behavioural analysis of learning memory in Bmi-1<sup>+/-</sup> mice



A: Representative sections showed the hippocampal (HP) morphology and cytoarchitecture of the Bmi-1<sup>+/-</sup> mice and WT mice. Scale bars=500 μm. B: Comparison of HP, cornu Ammonis (CA1) and DG volume between the Bmi-1<sup>+/-</sup> mice and WT mice. C: Comparison of gray matter volume in HP, CA1 and DG region between the Bmi-1<sup>+/-</sup> mice and WT mice. D: The proportion of gray matter volume in HP, CA1 and DG region in the total volume of each part. Compared with the WT mice, \**P* < 0.05 and \*\**P* < 0.01 (*n*=6).

图3 HE染色结合体视学分析测定Bmi-1<sup>+/-</sup>小鼠海马体积

Figure 3 Determination of hippocampal volume in Bmi-1<sup>+/-</sup> mice by HE staining combined with somatological analysis

进行标记,进行神经元数量统计,结果显示Bmi-1<sup>+/-</sup>小鼠DG区神经元数量明显少于WT小鼠(*P* < 0.05,图4A、E)。

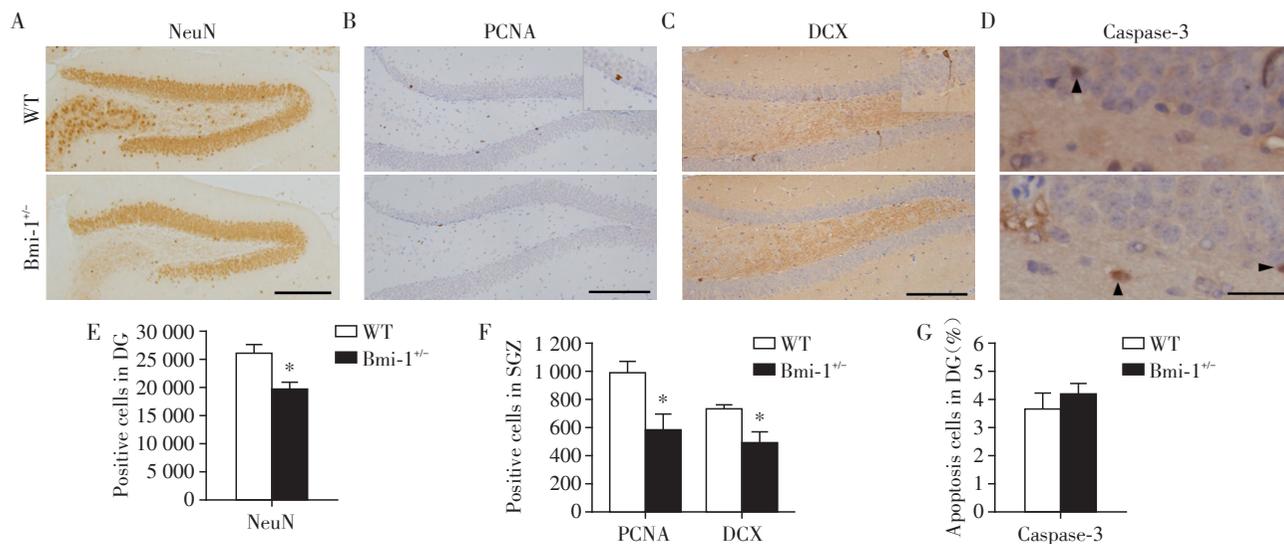
#### 2.4 半剂量敲除Bmi-1基因引起老龄小鼠海马DG区神经细胞增殖减少和新生神经元数量下降

既往研究认为,哺乳动物的神经元在出生后不再增殖和分化,这被称为稳定细胞<sup>[12]</sup>。成年动物脑中的许多神经干细胞可以在其一生中增殖和分化,不断补充由细胞凋亡或坏死引起的神经元丢失,并改善神经系统的结构和功能<sup>[13]</sup>。这些神经干细胞主要位于室管膜下区(subventricular zone, SVZ)和海马齿状回颗粒下层(subgranular zone, SGZ)。SGZ区域的神经干细胞分化成神经细胞后主要补充到海马CA3透明层区域和DG颗粒细胞层<sup>[14]</sup>。PCNA和DCX分别是干细胞增殖和分化为神经元的特异性标志物<sup>[15]</sup>。为进一步探究Bmi-1<sup>+/-</sup>小鼠SGZ区萎缩的原因,本研究进行了PCNA和DCX免疫组织化学染色与阳性细胞计数(图4B、C)。PCNA染色结果表明,Bmi-1<sup>+/-</sup>小鼠SGZ区PCNA阳性细胞数明显少于WT小鼠,两者之间有30%左右的差异(*P* < 0.05,图4B、F)。另外,Bmi-1<sup>+/-</sup>小鼠DCX阳性新生神经元

数目较野生型小鼠显著减少,神经元突起不够丰富(*P* < 0.05,图4C、F)。综上所述,SGZ中神经元增殖减少和新生神经元下降导致神经元数量减少,这可能是Bmi-1<sup>+/-</sup>小鼠DG区萎缩的主要原因。同时Caspase-3染色结果表明,Bmi-1<sup>+/-</sup>小鼠DG区凋亡细胞较WT小鼠略有升高,但两者差异无统计学意义(*P* > 0.05,图4D、G),进一步提示Bmi-1<sup>+/-</sup>小鼠DG体积缩小是由于其新生神经元的产生减少,并非由于其成熟神经元的死亡加剧导致。

#### 2.5 半剂量敲除Bmi-1基因导致老龄小鼠海马DG神经元线粒体变性

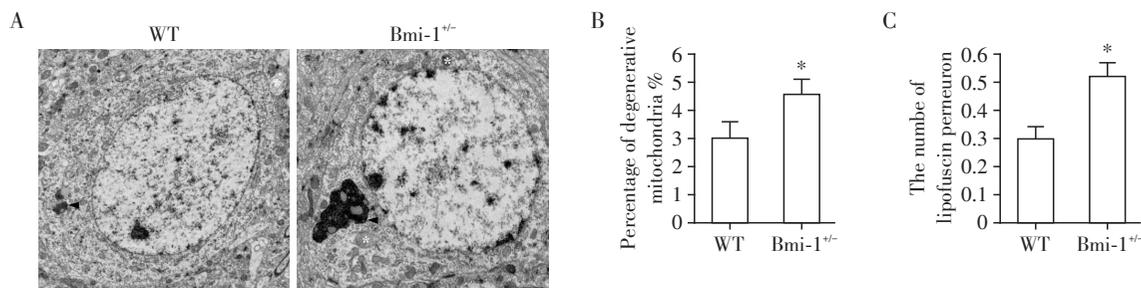
通过透射电子显微镜进一步观察两种基因型小鼠DG区颗粒细胞的超微结构变化。结果显示,Bmi-1<sup>+/-</sup>和WT小鼠的神经元结构基本完整,胞膜完整,核结构正常。胞浆内含有大量的线粒体、内质网、核糖体等细胞器(图5A)。然而,与WT小鼠相比,Bmi-1<sup>+/-</sup>小鼠线粒体出现膨大、肿胀,线粒体嵴减少的比例较WT小鼠增加(*P* < 0.05,图5A、B)。此外,Bmi-1<sup>+/-</sup>小鼠细胞质中脂褐素的数量明显高于WT小鼠(*P* < 0.05,图5A、C),提示半剂量敲除Bmi-1基因加剧老龄鼠DG区颗粒神经元线粒体损伤。



A: Representative sections showed neurons in the DG region of two genotypes. Scale bars=150  $\mu$ m. B, C: Representative sections showed the distribution of PCNA (B) and DCX (C) immunoreactive cells in the SGZ of Bmi-1<sup>+/-</sup> mice and WT mice. Scale bars=250  $\mu$ m. D: Representative sections showed neuronal apoptosis in the DG region of Bmi-1<sup>+/-</sup> mice and WT mice (indicated by arrows). Scale bars=10  $\mu$ m. E: Quantitative counting of NeuN immunoreactive cells of Bmi-1<sup>+/-</sup> mice and WT mice. F: Quantitative counting of PCNA and DCX immunoreactive cells of Bmi-1<sup>+/-</sup> mice and WT mice. G: Percentage of apoptotic cells of Bmi-1<sup>+/-</sup> mice and WT mice. Compared with the WT mice, \* $P < 0.05$  ( $n=6$ ).

图4 PCNA和DCX免疫组化染色检测Bmi-1<sup>+/-</sup>小鼠海马神经发生

Figure 4 Hippocampal neurogenesis in Bmi-1<sup>+/-</sup> mice detected by PCNA and DCX immunohistochemical staining



A: Representative images showed ultrastructure of neurons in the hippocampal DG granulos cell layer of Bmi-1<sup>+/-</sup> mice and WT mice. The arrow represents the degenerative mitochondria and lipofuscin deposition. Scale bars=2  $\mu$ m. B: The proportion of degenerative mitochondria in the hippocampal DG granulos cell layer of Bmi-1<sup>+/-</sup> mice and WT mice. C: The number of lipofuscin deposition per neuron in the hippocampal DG granulos cell layer of Bmi-1<sup>+/-</sup> mice and WT mice. Compared with the WT mice, \* $P < 0.05$  ( $n=6$ ).

图5 Bmi-1<sup>+/-</sup>小鼠海马DG区颗粒细胞层神经元的超微结构

Figure 5 Ultrastructure of neurons in the granule cell layer of the DG region of the hippocampus in Bmi-1<sup>+/-</sup> mice

## 2.6 半剂量敲除 Bmi-1 基因导致老龄小鼠海马细胞周期调控和线粒体能量代谢相关蛋白表达异常

为了确定半剂量敲除 Bmi-1 基因对海马 DG 区颗粒下层神经细胞增殖分化的影响,运用 Western blot 观察 Bmi-1 基因下游调控因子的表达情况。实验结果表明,尽管在 Bmi-1<sup>+/-</sup> 小鼠中 Bmi-1 基因的表达量较 WT 小鼠有所降低,但两者之间的差异并不明显 ( $P > 0.05$ )。在 Bmi-1 的下游调控因子中, p53 和 p27 均显著上调,差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 而 p19 也有所上调,但无显著性差异 ( $P > 0.05$ , 图 6A、B)。

基于电镜中观察到 Bmi-1<sup>+/-</sup> 小鼠颗粒神经元线粒体变性的比例较 WT 小鼠轻度增加,本研究通过 Western blot 对线粒体内参与能量代谢的酶进行观察以进一步明确长期的 Bmi-1 半剂量敲除对线粒体功能的影响。实验结果表明, Bmi-1 半剂量敲除后,线粒体氧化磷酸化过程中的重要酶类 NDUFV2 和 NDUFS3 的表达量均显著下调 ( $P < 0.05$ )。另外 DLD、DLST 是三羧酸循环中重要的催化酶,同样参与线粒体的能量代谢过程<sup>[16]</sup>。研究结果显示, DLST 在 Bmi-1<sup>+/-</sup> 小鼠中的表达显著下调 ( $P < 0.01$ ), 而 DLD 的表达虽有下调,但是差异无统计学意义 ( $P >$

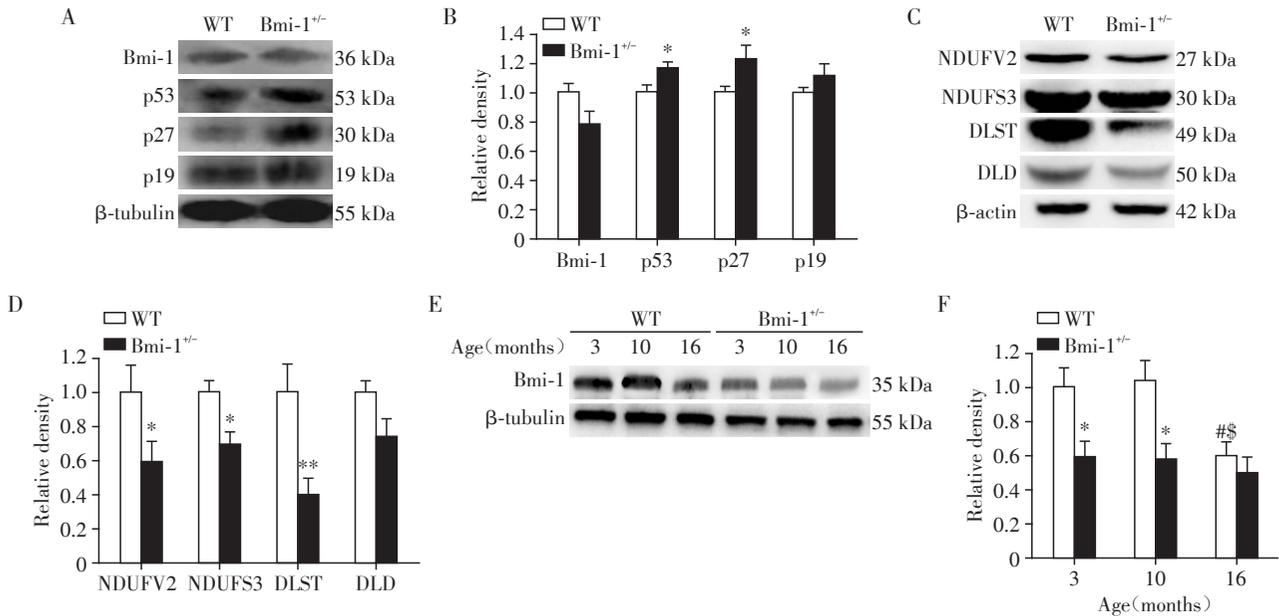
0.05, 图6C、D)。

同时本研究对3月龄、10月龄、16月龄的Bmi-1<sup>+/-</sup>小鼠和WT小鼠进行海马Bmi-1蛋白的检测,这3个月龄分别代表年轻小鼠,中年小鼠和老年小鼠。结果发现3月龄和10月龄时,同月龄的Bmi-1<sup>+/-</sup>小鼠和WT小鼠相比,Bmi-1<sup>+/-</sup>小鼠的Bmi-1蛋白表达显著低于对应月龄的WT小鼠( $P < 0.05$ ),而16月龄的Bmi-1<sup>+/-</sup>小鼠和WT小鼠相比,Bmi-1蛋白表达差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。WT小鼠在3月龄和10月

龄时Bmi-1表达显著高于16月龄的WT小鼠( $P < 0.05$ ),表明随着年龄增长,WT小鼠的Bmi-1表达下降(图6E、F)。

### 3 讨论

Bmi-1作为一种重要的调控基因,参与细胞周期、氧化应激、线粒体功能、DDR通路、干细胞增殖和自我更新<sup>[17]</sup>。研究表明,Bmi-1基因的缺失可导致肾脏、心血管系统、造血系统和生殖系统等多个



A, B: Representative bands of Western blot and densitometry analysis of the expression levels of cell cycle related regulatory proteins. C, D: Representative bands of Western blot and densitometry analysis of the expression levels of mitochondrial energy metabolism related proteins and antioxidant indicators. E, F: Representative bands of Western blot and densitometry analysis of the expression levels of Bmi-1 in the hippocampus. Compared with the WT mice, \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$ ; compared with the 3-month-old WT mice, # $P < 0.05$ ; compared with the 10-month-old WT mice, \$ $P < 0.05$  ( $n=8$ ).

图6 Bmi-1<sup>+/-</sup>和WT小鼠中海马中细胞周期调节和线粒体能量代谢相关蛋白的表达水平

Figure 6 Expression levels of proteins related to cell cycle regulation and mitochondrial energy metabolism of the hippocampus in Bmi-1<sup>+/-</sup> mice and WT mice

器官系统的过早衰老<sup>[18-19]</sup>。本课题组前期研究已证实,Bmi-1缺陷基因可以诱导幼龄小鼠发生神经退行性样变性<sup>[5]</sup>;8月龄Bmi-1<sup>+/-</sup>小鼠表现出脑过早衰老,包括轻度长期记忆丧失、丙二醛等氧化应激指标升高、海马锥体神经元中脂褐素沉积和神经元凋亡增加等<sup>[6]</sup>。此外,有研究证实,Bmi-1基因的表达随着小鼠和人类脑神经元的衰老而下调,提示Bmi-1可能参与正常脑衰老的过程<sup>[7]</sup>。然而,Bmi-1基因在衰老小鼠脑中的长期作用尚不清楚。本研究,选择17月龄的Bmi-1<sup>+/-</sup>小鼠作为实验对象,观察半剂量敲除Bmi-1基因对衰老小鼠的影响。结果表明,半剂量敲除Bmi-1基因可抑制衰老小鼠海马新生神经元的

增殖,导致海马DG体积特异性缩小,长期记忆丧失。

Morris水迷宫验证海马结构在动物学习记忆功能中发挥重要作用,而学习和记忆的过程,取决于海马体结构的完整性<sup>[20]</sup>,但具体机制尚不清楚。有研究报道,空间学习能力损伤的程度与海马组织损伤体积有关<sup>[21-22]</sup>。本研究表明,Bmi-1<sup>+/-</sup>小鼠的长期记忆功能受损,表现为海马DG区体积和颗粒神经元数量减少。进一步的实验结果提示神经元的减少与DG颗粒细胞神经干细胞的分化和增殖减少有关。本课题组前期研究发现8月龄的Bmi-1<sup>+/-</sup>小鼠空间记忆较同月龄WT小鼠没有明显变化<sup>[6]</sup>。本研究发现17月龄的Bmi-1<sup>+/-</sup>小鼠表现出明显的长期记忆

障碍。据此可推测成年小鼠 Bmi-1 基因部分缺失导致的海马神经元损伤不足以影响整个海马功能,但这种损伤作用随着衰老进程逐渐显现出来。然而,这一过程中的具体机制和发生这种变化的节点尚不明确,需要进一步实验验证。

此外,细胞线粒体损伤引起的能量代谢效率较低,也可能影响神经干细胞的增殖和分化。线粒体作为细胞能量产生的主要部位,参与调节细胞中糖、脂、蛋白质的代谢,直接或间接参与细胞增殖、分化、凋亡等信号通路的转导<sup>[23-24]</sup>。有充分的证据表明,线粒体功能障碍是导致细胞衰老、坏死和凋亡的一个重要原因<sup>[25-26]</sup>,并参与多种疾病,如线粒体肌病和神经退行性疾病发病进程<sup>[27-28]</sup>。虽然也有一些文献报道了线粒体在干细胞中的重要作用<sup>[29]</sup>,在人类胚胎干细胞中,当细胞自我更新时,细胞核周围的线粒体数量减少,线粒体嵴和氧化能力降低<sup>[30]</sup>。但线粒体对衰老进程中的中枢神经干细胞增殖和分化的影响尚不清楚。成年动物的神经干细胞可能需要更多的耗氧量和能量生成来维持高代谢状态,其具体机制有待进一步研究。

Bmi-1 基因参与细胞内的氧化应激反应。本课题组的前期研究已证明 Bmi-1<sup>+/-</sup>小鼠体内活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生和清除功能失衡<sup>[5,7,31]</sup>。考虑到细胞内 ROS 主要是线粒体的能量代谢的副产物,本研究进一步观察了线粒体的形态结构和相关能量代谢酶类的表达。结果显示, Bmi-1<sup>+/-</sup>小鼠线粒体存在着一定程度的损伤,能量代谢体系酶 NDUFB2、NDUFB3 和 DLST 表达水平下降,提示 Bmi-1<sup>+/-</sup>小鼠线粒体能量代谢能力减弱,可能是导致其空间认知功能障碍的一个重要因素。

大量研究结果表明, Bmi-1 基因能够通过 p16<sup>Ink4a</sup>/cyclinD/pRb 和 p19<sup>Arf</sup>/MDM2/p53 来调节多种干细胞的增殖,并与 Bmi-1 表达水平密切相关<sup>[32]</sup>。本课题组前期研究发现,8月龄 Bmi-1<sup>+/-</sup>小鼠海马 Bmi-1 表达水平显著低于同月龄的 WT 小鼠<sup>[6]</sup>。但是17月龄 Bmi-1<sup>+/-</sup>小鼠和 WT 小鼠海马 Bmi-1 的表达量并没有显著的差异,这可能与小鼠在衰老的过程中神经元 Bmi-1 表达随之降低有关<sup>[7]</sup>,进一步 Western blot 检测也发现,16月龄 WT 小鼠与3月龄和10月龄的 WT 小鼠相比, Bmi-1 的表达水平有明显下降。但 Bmi-1 负性调控的下游老化相关周期蛋白 p53 和 p27 的表达水平在老龄 Bmi-1<sup>+/-</sup>小鼠海马显著增加,这可能与 Bmi-1 的长期低表达导致相关调控衰老的指标上调相关,这些指标调控 p53 和 p27 的表达,进而让

老龄 Bmi-1<sup>+/-</sup>小鼠表现出更明显的衰老表型。有文献报道, Bmi-1 抑制 INK4a 基因,该基因编码肿瘤抑制因子 p16,因此, Bmi-1 缺失诱导 p16 表达上调和过早衰老<sup>[33]</sup>,而 p16 作为重要的肿瘤抑制蛋白,在衰老过程中发生上调,可以通过抑制 MDM2 相关泛素化来抑制 p53 更新,维持 p53 的高表达<sup>[34]</sup>。而 p53 蛋白上调可发挥对 p27 蛋白表达的正向作用<sup>[35]</sup>。因此,老龄 Bmi-1<sup>+/-</sup>小鼠可能通过上调 p16 水平进一步促进老化相关周期蛋白 p53 和 p27 的表达。其具体机制有待进一步研究。同时本研究发现 Bmi-1<sup>+/-</sup>小鼠 DG 区 PCNA 阳性增殖细胞和 DCX 阳性新生神经元的数量显著减少。这些结果提示 Bmi-1 对于维持衰老过程中海马神经发生和海马脑容量具有重要作用。

综上所述,本研究表明 Bmi-1 基因的半剂量敲除抑制老年小鼠海马中新生神经元生成,海马 DG 区体积特异性缩小,并导致长期记忆功能障碍。这一发现为今后进一步探索 Bmi-1 基因调控脑衰老的机制及相关抗衰老靶点提供了实验理论基础。

#### 利益冲突声明:

我们声明,肖明作为通讯作者之一,担任本期刊副主编,未参与本文的评审与决策。审稿遵循双盲原则,所有编辑决策由独立编辑和审稿人完成,确保评审公正透明。

#### Conflict of Interests:

We declare that Xiao Ming, as one of the corresponding authors and the associate editor-in-chief of this journal, did not participate in the review or decision-making of this article. The review process followed a double-blind principle, and all editorial decisions were made by independent editors and reviewers, ensuring fairness and transparency in the review process.

#### [参考文献]

- [1] LIU R M. Aging, cellular senescence, and Alzheimer's disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(4): 1989
- [2] WILSON M M, DANIELIAN P S, SALUS G, et al. Bmi1 is required for melanocyte stem cell maintenance and hair pigmentation[J]. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2023, 36(5): 399-406
- [3] LU J H, SUN W W, LIU B Y, et al. Chk2 modulates Bmi1-deficiency-induced renal aging and fibrosis via oxidative stress, DNA damage, and p53/TGFβ1-induced epithelial-mesenchymal transition[J]. *Int J Biol Sci*, 2024, 20(6): 2008-2026
- [4] DONG Q H, OH J E, CHEN W, et al. Radioprotective effects of Bmi-1 involve epigenetic silencing of oxidase genes and enhanced DNA repair in normal human keratinocytes[J]. *J Invest Dermatol*, 2011, 131(6): 1216-1225
- [5] CAO G L, GU M X, ZHU M, et al. Bmi-1 absence causes

- premature brain degeneration[J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e32015
- [6] GU M X, SHEN L H, BAI L, et al. Heterozygous knockout of the Bmi-1 gene causes an early onset of phenotypes associated with brain aging[J]. *Age*, 2014, 36(1): 129-139
- [7] ABDOUH M, CHATOO W, EL HAJJAR J, et al. Bmi1 is down-regulated in the aging brain and displays antioxidant and protective activities in neurons[J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e31870
- [8] KRAEUTER A K, GUEST P C, SARNYAI Z. The Y-maze for assessment of spatial working and reference memory in mice[J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1916: 105-111
- [9] OTHMAN M Z, HASSAN Z, CHE HAS A T. Morris water maze: a versatile and pertinent tool for assessing spatial learning and memory[J]. *Exp Anim*, 2022, 71(3): 264-280
- [10] LV K S, TONG W. A protein synthesis brake for hematopoietic stem cell maintenance[J]. *Genes Dev*, 2022, 36(15/16): 871-873
- [11] PEARCE J M, GEORGE D N, HASELGROVE M, et al. The influence of hippocampal lesions on the discrimination of structure and on spatial memory in pigeons (*Columba livia*) [J]. *Behav Neurosci*, 2005, 119(5): 1316-1330
- [12] ALVAREZ-BUYLLA A, LOIS C. Neuronal stem cells in the brain of adult vertebrates [J]. *Stem Cells*, 1995, 13(3): 263-272
- [13] JOHANSSON C B. Mechanism of stem cells in the central nervous system[J]. *J Cell Physiol*, 2003, 196(3): 409-418
- [14] OBERNIER K, ALVAREZ - BUYLLA A. Neural stem cells: origin, heterogeneity and regulation in the adult mammalian brain [J]. *Development*, 2019, 146(4): dev156059
- [15] VON HALBACH O. Immunohistological markers for proliferative events, gliogenesis, and neurogenesis within the adult hippocampus[J]. *Cell Tissue Res*, 2011, 345(1): 1-19
- [16] SHEN T, WANG H Y, TANG B, et al. The impact of RNA binding proteins and the associated long non-coding RNAs in the TCA cycle on cancer pathogenesis[J]. *RNA Biol*, 2023, 20(1): 223-234
- [17] ZACZEK A, JÓŹWIAK P, KRZEŚLAK A. Participation of BMI-1 protein in cancer[J]. *Postepy Hig Med Dosw*, 2017, 71(0): 811-824
- [18] JACOBS J J, KIEBOOM K, MARINO S, et al. The oncogene and polycomb-group gene bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus[J]. *Nature*, 1999, 397(6715): 164-168
- [19] YAMAKOSHI K, KATANO S, IIDA M, et al. Dysregulation of the Bmi-1/p16(Ink4a) pathway provokes an aging-associated decline of submandibular gland function [J]. *Aging Cell*, 2015, 14(4): 616-624
- [20] YEE L T S, HANNULA D E, TRANEL D, et al. Short-term retention of relational memory in amnesia revisited: accurate performance depends on hippocampal integrity[J]. *Front Hum Neurosci*, 2014, 8: 16
- [21] MOSER E, MOSER M B, ANDERSEN P. Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions[J]. *J Neurosci*, 1993, 13(9): 3916-3925
- [22] POU CET B, SAVE E, LENCK-SANTINI P P. Sensory and memory properties of hippocampal place cells [J]. *Rev Neurosci*, 2000, 11(2/3): 95-111
- [23] GUO L, YANG Y, SHENG Y J, et al. Mechanism of piperine in affecting apoptosis and proliferation of gastric cancer cells via ROS-mitochondria-associated signalling pathway[J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(20): 9513-9522
- [24] CHICHERIN I V, DUKHALIN S V, KHANNANOV R A, et al. Functional diversity of mitochondrial peptidyl-tRNA hydrolase ICT1 in human cells [J]. *Front Mol Biosci*, 2021, 8: 716885
- [25] HABIBALLA L, SALMONOWICZ H, PASSOS J F. Mitochondria and cellular senescence: implications for musculoskeletal ageing[J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 132: 3-10
- [26] MIWA S, KASHYAP S, CHINI E, et al. Mitochondrial dysfunction in cell senescence and aging [J]. *J Clin Invest*, 2022, 132(13): e158447
- [27] AHUJA A S. Understanding mitochondrial myopathies: a review[J]. *PeerJ*, 2018, 6: e4790
- [28] SWERDLOW R H. The neurodegenerative mitochondriopathies[J]. *J Alzheimers Dis*, 2009, 17(4): 737-751
- [29] JASRA I T, CUESTA-GOMEZ N, VERHOEFF K, et al. Mitochondrial regulation in human pluripotent stem cells during reprogramming and  $\beta$  cell differentiation[J]. *Front Endocrinol*, 2023, 14: 1236472
- [30] CHO Y M, KWON S, PAK Y K, et al. Dynamic changes in mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during the spontaneous differentiation of human embryonic stem cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 348(4): 1472-1478
- [31] LI K, LI Y, YU Y J, et al. Bmi-1 alleviates adventitial fibroblast senescence by eliminating ROS in pulmonary hypertension[J]. *BMC Pulm Med*, 2021, 21(1): 80
- [32] GRINSTEIN E, WERNET P. Cellular signaling in normal and cancerous stem cells[J]. *Cell Signal*, 2007, 19(12): 2428-2433
- [33] ITAHANA K, ZOU Y, ITAHANA Y, et al. Control of the replicative life span of human fibroblasts by p16 and the polycomb protein Bmi-1[J]. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(1):

- 193–200
- [15] HOCHREUTER M Y, DALL M, TREEBAK J T, et al. MicroRNAs in non-alcoholic fatty liver disease: progress and perspectives[J]. *Mol Metab*, 2022, 65: 101581
- [16] TORRES J L, NOVO-VELEIRO I, MANZANEDO L, et al. Role of microRNAs in alcohol-induced liver disorders and non-alcoholic fatty liver disease[J]. *World J Gastroenterol*, 2018, 24(36): 4104–4118
- [17] GJORGJIEVA M, SOBOLEWSKI C, DOLICKA D, et al. miRNAs and NAFLD: from pathophysiology to therapy[J]. *Gut*, 2019, 68(11): 2065–2079
- [18] FANG Z, DOU G, WANG L. MicroRNAs in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17(7): 1851–1863
- [19] WANG X, HE Y, MACKOWIAK B, et al. MicroRNAs as regulators, biomarkers and therapeutic targets in liver diseases[J]. *Gut*, 2021, 70(4): 784–795
- [20] LI S J, CHEN X, ZHANG H J, et al. Differential expression of microRNAs in mouse liver under aberrant energy metabolic status [J]. *J Lipid Res*, 2009, 50(9): 1756–1765
- [21] 侯天禄, 陈天阳, 成 扬. MiR-199a-3p 对脂肪变性的肝细胞 TG 含量及 Sp1 表达的影响[J]. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2019, 28(6): 660–663
- [22] GOLABI P, OWRANGI S, YOUNOSSI Z M. Global perspective on nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis - prevalence, clinical impact, economic implications and management strategies [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2024, 59(Suppl 1): S1–S9
- [23] TARGHER G, TILG H, BYRNE C D. Non-alcoholic fatty liver disease: a multisystem disease requiring a multidisciplinary and holistic approach [J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2021, 6(7): 578–588
- [24] POWELL E E, WONG V W, RINELLA M. Non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Lancet*, 2021, 397(10290): 2212–2224
- [25] ESLAM M, NEWSOME P N, SARIN S K, et al. A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: an international expert consensus statement [J]. *J Hepatol*, 2020, 73(1): 202–209
- [26] ESLAM M, SANYAL A J, GEORGE J. MAFLD: a consensus-driven proposed nomenclature for metabolic associated fatty liver disease[J]. *Gastroenterology*, 2020, 158(7): 1999–2014
- [27] VESPOLI C, MOHAMED I A, NASSER K M, et al. Metabolic-associated fatty liver disease in childhood and adolescence[J]. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2023, 52(3): 417–430
- [28] 胡默然, 吴周璐, 赵晨曦, 等. 神经节苷脂 GM3 在非酒精性脂肪肝炎小鼠肝脏中的表达变化[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2022, 42(2): 153–159
- [29] ESLAM M, EL-SERAG H B, FRANCO S, et al. Metabolic (dysfunction)-associated fatty liver disease in individuals of normal weight[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2022, 19(10): 638–651
- [30] WANG X Y, GUO M, WANG Q, et al. The patatin-like phospholipase domain containing protein 7 facilitates VLDL secretion by modulating ApoE stability[J]. *Hepatology*, 2020, 72(5): 1569–1585
- [31] HAO J W, WANG J, GUO H L, et al. CD36 facilitates fatty acid uptake by dynamic palmitoylation-regulated endocytosis[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 4765
- [32] GLATZ J, HEATHER L C, LUIKEN J. CD36 as a gatekeeper of myocardial lipid metabolism and therapeutic target for metabolic disease[J]. *Physiol Rev*, 2024, 104(2): 727–764
- [33] ZHAO L, ZHANG C, LUO X X, et al. CD36 palmitoylation disrupts free fatty acid metabolism and promotes tissue inflammation in non-alcoholic steatohepatitis[J]. *J Hepatol*, 2018, 69(3): 705–717
- [收稿日期] 2024-07-02  
(本文编辑: 戴王娟)

(上接第 1482 页)  
389–401

- [34] AL-KHALAF H H, ABOUSSEKHRA A. p16 controls p53 protein expression through miR-dependent destabilization of MDM2[J]. *Mol Cancer Res*, 2018, 16(8): 1299–1308
- [35] HSU S P, LIN P H, CHOU C M, et al. Progesterone up-

regulates p27 through an increased binding of the progesterone receptor-A-p53 protein complex onto the non-canonical p53 binding motif in HUVEC [J]. 2019, 185: 163–171

[收稿日期] 2024-08-10  
(本文编辑: 戴王娟)