

内质网应激诱导的自噬对新生大鼠坏死性小肠结肠炎的影响

王丽红 杨晓丽 李 静

摘 要 **目的** 探讨抑制内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)诱导的自噬对新生大鼠坏死性小肠结肠炎(necrotizing enterocolitis, NEC)的影响。**方法** 首先建立新生大鼠 NEC 模型,然后从中分离提取出肠上皮细胞,分为对照组、抑制组、诱导组。对照组正常培养,抑制组加 4-苯基丁酸,诱导组加衣霉素处理 24h。采用酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测各组细胞炎症细胞因子肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、肠脂酸结合蛋白(intestinal fatty acid binding protein, I-FABP)的表达水平;实时荧光定量聚合酶链反应(real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)检测各组细胞 ERS 标志物葡萄糖调节蛋白 78(glucose regulated protein 78, GRP78)、氧调节蛋白 150(oxygen-regulated protein 150, ORP150)的 mRNA 表达水平;Western blot 法检测各组细胞自噬相关蛋白 LC3 II/I、p62 的表达水平。**结果** 与对照组比较,抑制组 p62 表达明显增高, TNF- α 、I-FABP、GRP78、ORP150、LC3 II/I 表达显著降低,而诱导组 p62 表达明显降低, TNF- α 、I-FABP、GRP78、ORP150、LC3 II/I 表达显著增高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 抑制 ERS 诱导的自噬激活可减轻 NEC 新生大鼠肠黏膜损伤和炎症反应,改善肠道屏障功能。

关键词 内质网应激 自噬 坏死性小肠结肠炎 肠上皮细胞 作用机制

中图分类号 R722

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2024.02.021

Effect of Endoplasmic Reticulum Stress-induced Autophagy on Necrotizing Enterocolitis in Neonatal Rats. WANG Lihong, YANG Xiaoli, LI Jing. Shanxi People's Hospital, Shanxi 030000, China

Abstract **Objective** To investigate the effect of inhibiting autophagy induced by endoplasmic reticulum stress (ERS) on necrotizing enterocolitis (NEC) in neonatal rats. **Methods** First, the NEC model of neonatal rats was established. Then, the intestinal epithelial cells were isolated and divided into three groups: control group, inhibition group and induction group. The control group was cultured normally, the inhibition group was added with 4-phenylbutyric acid, and the induction group was added with tunicamycin for 24 hours. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the expression of the cellular inflammatory cytokines tumor necrosis factor- α (TNF- α) and intestinal fatty acid binding protein (I-FABP) in each group. Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used to detect the mRNA expression level of the markers of ERS glucose regulated protein 78 (GRP78) and oxygen-regulated protein 150 (ORP150). Western blot was used to detect the expression of autophagy related proteins LC3 II/I and p62. **Results** Compared with the control group, the expression of p62 in the inhibition group increased significantly, the expression of TNF- α , I-FABP, GRP78, ORP150, LC3 II/I in the inhibition group was significantly decreased, while the expression of p62 in the induction group was significantly decreased, the expressions of TNF- α , I-FABP, GRP78, ORP150, LC3 II/I were significantly increased, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Inhibition of ERS induced autophagy activation can alleviate intestinal mucosal injury and inflammatory response in neonatal rats with NEC and improve intestinal barrier function.

Key words Endoplasmic reticulum stress; Autophagy; Necrotizing enterocolitis; Intestinal epithelial cells; Mechanism of action

新生儿坏死性小肠结肠炎(necrotizing enterocolitis, NEC)是一种严重的急性肠道炎症性疾病。据报道,其发生率为 3%~15%^[1]。其中高达 50% 的患儿

需进行手术治疗,且术后发生严重并发症(如脑瘫和认知障碍)的可能性很大^[2,3]。研究发现,该病死亡率为 18.5%~28.8%,而且在过去几十年里并没有明显变化^[4]。此外,NEC 患儿住院时间更长,治疗费用更高^[5]。因此,探索 NEC 的发病机制及治疗方法已成为临床研究的重点。

NEC 有复杂的、多因素的病理生理学,潜在的作用机制尚不明确。Qiao 等^[6]研究显示,内质网应激

基金项目:山西省卫生健康委员会科研课题(2020024)

作者单位:030000 太原,山西医科大学儿科医学系(王丽红);

036200 太原,山西省人民医院儿科(杨晓丽、李静)

通信作者:杨晓丽,电子邮箱:yangxlsx1989@163.com

(endoplasmic reticulum stress, ERS) 可诱发肠道炎症, 导致肠黏膜屏障破坏, 进而诱发多种疾病。大量研究表明, ERS 与克罗恩病和溃疡性结肠炎等炎症性肠病及结肠癌的发病机制有关^[7,8]。Lau 等^[9]研究表明, ERS 也可能与急性肠道损伤的发病机制有关。Zhu 等^[10]报道, 与肠道炎症密切相关的内质网是 NEC 发病机制的关键参与者, 抑制 ERS 可改善 NEC 大鼠肠道损伤。研究表明, 自噬激活发生在 NEC 肠道组织中, 抑制自噬可以对 NEC 起保护作用^[11, 12]。王国琴等^[13]研究显示, ERS 和自噬两者之间存在着重要的联系。ERS 介导的自噬机制非常复杂, 但目前国内外对 ERS 诱导的自噬和 NEC 关系研究甚少。

本课题组在前期实验中已成功建立新生大鼠 NEC 模型^[14]。在此基础上, 本课题拟从体外细胞实验开展进一步研究: 建立新生大鼠 NEC 模型, 分离提取出肠上皮细胞, 检测炎性细胞因子、ERS 标志物和自噬相关蛋白等的表达, 探究抑制 ERS 诱导的自噬是否对 NEC 有保护作用, 阐明其对 NEC 作用机制的影响, 旨在为 NEC 的治疗提供实验参考。

材料与方法

1. 实验动物与主要试剂: 健康新生清洁级 Sprague - Dawley (SD) 大鼠 10 只, 雌雄不限, 体质量 5 ~ 10g, 由山西省人民医院动物实验室 (实验动物许可证号: SCXK 晋 2019 - 0001) 提供, 按无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 级要求饲养。脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS, 血清型 055:B55) 购自北京 Sloarbio 公司; 衣霉素 (tunicamycin, Tm, ERS 诱导剂)、4 - 苯基丁酸 (4 - phenylbutyric acid, 4 - PBA, ERS 抑制剂) 均购自上海 Macklin 公司; LC3 酶联免疫吸附试验 (enzyme - linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒、p62 ELISA 试剂盒均购自上海酶联生物科技有限公司; 反转录试剂盒、实时荧光定量聚合酶链反应 (real - time quantitative polymerase chain reaction, RT - qPCR) 试剂盒均购自日本 TaKaRa 公司; BCA 蛋白含量检测试剂盒、LC3 及 p62 抗体、羊抗兔 IgG - HRP 均购自江苏凯基生物技术股份有限公司; 引物由通用生物 (安徽) 股份有限公司合成。代乳品配制: 雅培婴儿配方奶粉 5g, 脂肪乳 50ml, 蛋白粉 8g, 加灭菌水至 100ml。

2. NEC 动物模型的建立: 所有动物实验方案均经山西省人民医院动物保护委员会批准 [伦理学审批号: (2019) 省医伦审字第 105 号]。通过人工喂养 + 缺氧 + 冷刺激 + LPS 灌胃多因素联合在新生 SD

大鼠中诱导 NEC 模型。每天于 8:00、12:00、16:00、20:00 时人工喂养新生大鼠 4 次配方奶 (起始量为 0.15ml, 后逐渐增加); 每天于 8:00、20:00 时进行缺氧应激 (暴露于纯氮气 60s), 然后置于冰箱进行冷暴露 (4℃, 10min); 后于每天 16:00 时经灌胃针注入 LPS (10mg/kg 稀释于配方奶中), 连续 2 天。空腹 12h 后以颈椎脱臼法处死动物, 收集肠组织 (回盲部近端 2cm) 用于后续实验。

3. 肠上皮细胞的提取、培养: 如汪煜鹏^[15]所述, 先进行试剂配制: ①细胞洗液: 50ml 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) + 0.5ml 青霉素 (100U/ml)、链霉素 (0.1mg/ml) 双抗; ②消化液: 15ml DMEM/F12 培养基 + 1.5mg 中性蛋白酶 II (0.1mg/ml) + 4.5mg 胶原蛋白酶 XI (0.3mg/ml); ③分散液: 1.00g 山梨醇 + 2.5ml 胎牛血清 + 普通 DMEM/F12 培养基定容至 50ml; ④完全培养基: 5ml 胎牛血清 + 0.5ml 青链霉素双抗 + 0.4ml EGF (2.5μg/ml) 稀释液 + DMEM/F12 培养基定容至 50ml。

参照沈雁等^[16]的方法, 用细胞洗液将获取的肠组织反复冲洗 3 ~ 5 次后将其剪碎, 吸取含碎肠组织的溶液到 15ml 的离心管中。加 10ml 的冰 PBS 溶液, 轻柔地吹打, 反复几次直至上清液变澄清, 16099 × g 离心 3min, 弃上清。向沉淀中加入适量消化液在 37℃ 下消化 30min, 每隔 10min 摇匀 1 次, 静置 1min 后取上清入 15ml 离心管中, 重复上述操作 2 次。向上清液中加 10ml 分散液, 吹打混匀, 16099 × g 离心 3min, 弃上清。沉淀用分散液重悬, 重复 5 ~ 6 次, 直到上清液澄清。加入 5ml 完全培养基重悬, 接种于培养瓶中, 放入细胞培养箱 (37℃、5% CO₂) 进行细胞培养, 每 2 ~ 3 天换液 1 次, 当细胞密度达 80% ~ 90% 后进行后续实验。

4. 分组及干预方法: 取对数生长期的细胞分为 3 组: 对照组 (用不含药物的完全培养基孵育)、抑制组 (加 5mmol/L 的 4 - PBA 处理细胞)、诱导组 (加 10μg/ml 的 Tm 处理细胞), 均处理 24h^[6]。

5. ELISA 检测炎性细胞因子: 将待测样本室温放置 20min, 于各反应孔中依次加入标准品和样本 50μl, 每孔加入酶标试剂 100μl, 空白孔除外。用封板膜封板后振荡、混匀后置 37℃ 温育 60min。每孔加洗涤液人工洗涤 5 次, 后加入 50μl 显色剂 A、B, 轻轻震荡混匀, 37℃ 避光显色 15min, 加终止液 50μl 终止反应。以空白孔调零, 采用酶标仪记录 450nm 波长

处各孔的吸光度(A)值,绘制标准曲线并计算出各组样本肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、肠脂酸结合蛋白(intestinal fatty acid binding protein, I-FABP)的质量浓度。

6. RT-qPCR 检测 ERS 标志物:利用 Trizol 试剂从培养的肠上皮细胞中分离总 mRNA。然后,通过反转录试剂盒将提取的 RNA 合成互补 DNA。取 cDNA 以 β -actin 为内参进行 RT-qPCR 检测,运用 RT-qPCR 仪参照试剂盒说明书设置程序:95℃ 变性 10min,然后 95℃ 变性 15s,60℃ 退火 20s,72℃ 延伸 28 个循环 40s。完成循环步骤后,72℃ 再延伸 5min。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算葡萄糖调节蛋白 78(glucose regulated protein 78, GRP78)、氧调节蛋白 150(oxygen-regulated protein 150, ORP150)相对基因表达量。

表 1 RT-qPCR 引物序列

基因名称	引物序列(5'→3')
GAPDH(鼠)	上游引物:AGGTGTCTCTCTGTGACTTCAA
	下游引物:CTGTTGCTGTAGCCATATTCATTG
GRP78	上游引物:TCGACTTGGGGACCACTAT
	下游引物:AGTGAAGGCCACATACGACG
ORP150	上游引物:TCAGCTATGGTGTCTTCCGC
	下游引物:CACCGTTTGGTAGGTCACGA

7. Western blot 法检测自噬相关蛋白:处理后的细胞在含有 1% 苯甲基磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)、10% 蛋白酶抑制剂和 1% 磷酸化抑

制剂的冷 RIPA (radioimmunoprecipitation assay, RIPA 裂解液)溶液中裂解 30min,收集蛋白用于后续实验。通过聚氨基丙烯酸正丁酯(bicinchoninic acid, BCA)蛋白试剂盒测定样品的蛋白质浓度。总蛋白样品经 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)电泳并转移至聚偏氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上。经 5% 脱脂牛奶室温封闭 2h 后,把膜与相应的一抗 4℃ 下孵育过夜。次日,膜经 Tris 缓冲盐吐温-20 溶液(tris buffered saline tween-20, TBST)洗涤 3 次后,与相应的二抗室温下孵育 2h, TBST 洗膜 3 次。采用成像分析系统扫描获得的印迹,用 Gel-Pro32 软件进行灰度值分析。通过将条带强度归一化为 GAPDH 带强度来确定每个通道的 LC3 II/I、p62 蛋白表达水平。

8. 统计学方法:应用 SPSS 27.0 统计学软件对数据进行统计分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 LSD 法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 各组肠上皮细胞炎性细胞因子比较:ELISA 检测结果显示,与对照组比较,抑制组 TNF- α 、I-FABP 水平明显降低,而诱导组的表达水平显著增高,差异均有统计学意义($P < 0.05$),详见图 1。

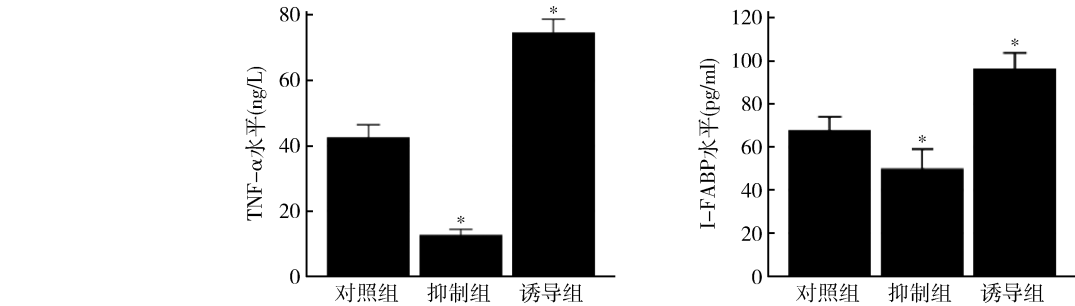


图 1 各组细胞炎性细胞因子表达比较
与对照组比较, * $P < 0.05$

2. 各组肠上皮细胞 ERS 标志物 mRNA 比较:RT-qPCR 检测结果显示,与对照组比较,抑制组 GRP78、ORP150 的 mRNA 相对表达量明显降低,而诱导组明显增高,差异均有统计学意义($P < 0.05$),详见图 2。

3. 各组肠上皮细胞内自噬相关蛋白比较:Western blot 法检测结果显示,与对照组比较,抑制组 p62

蛋白水平明显升高,LC3 II/I 蛋白水平显著降低;而诱导组则相反,差异均有统计学意义($P < 0.05$),详见图 3、图 4。

讨 论

NEC 的发病机制极其复杂,其发病与早产、配方奶喂养、肠道微生物菌群失调、炎症、缺氧缺血性损伤等有关,随之引发一系列病理生理变化,最终导致肠

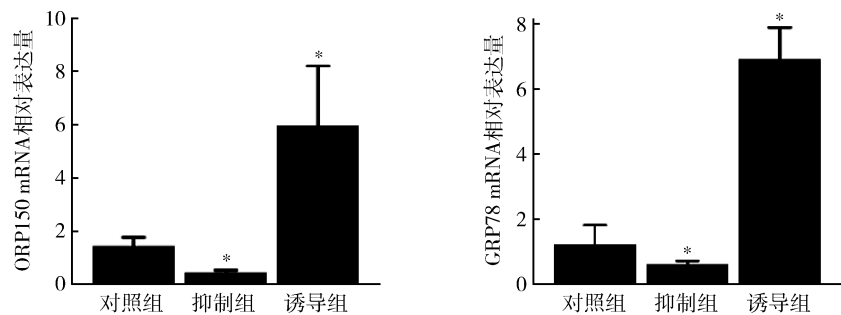


图 2 各组细胞 ERS 标志物 mRNA 相对表达量比较
与对照组比较, * $P < 0.05$

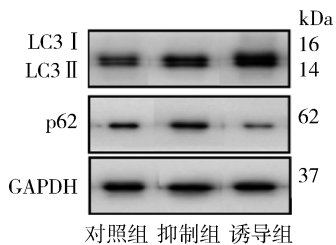


图 3 各组细胞自噬相关蛋白条带

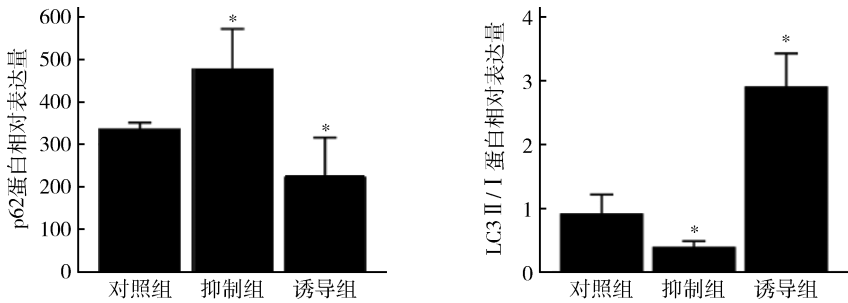


图 4 各组细胞自噬相关蛋白表达比较
与对照组比较, * $P < 0.05$

性变化^[20]。此外,它还被认为是一种可预测 NEC 发展与肠组织坏死程度相关的生物学标志物^[21]。ERS 和自噬在多种胃肠道疾病的发生、发展过程中起重要作用。内质网主要参与蛋白质的加工和修饰,指导其正确的折叠和组装。在各种不利刺激的作用下,内质网功能发生紊乱,大量错误折叠蛋白质堆积就会启动 ERS^[22]。重度或持续的 ERS 则会激活炎症小体,甚至引起细胞凋亡^[23]。在 ERS 发生时,内质网驻留蛋白 GRP78 首先从内质网膜上解离,以帮助被破坏的蛋白质重新折叠或降解,其表达水平可反映 ERS 的严重程度,被认为是 ERS 的生物学标志物之一^[24]。

ORP150 作为一种机体应对应激时产生的重要 ERS 伴侣分子标志物,它的高表达与许多 ERS 相关

黏膜屏障功能障碍、通透性改变、发生不可逆性损伤^[17]。参与 NEC 的炎性介质包括 TNF - α 、白细胞介素等,TNF - α 参与活化多种炎性细胞,促进其释放大量的氧自由基和蛋白酶导致肠组织损伤^[18];还可诱导线粒体发生功能障碍甚至使其凋亡,引发肠上皮细胞发生凋亡^[19]。I - FABP 在肠道缺血性疾病中的表达水平明显增高,可反映肠黏膜损伤程度和通透

疾病密切相关^[25]。当 ERS 无法清除超负荷的折叠紊乱蛋白时,细胞自噬将被激活以清除这类蛋白维持细胞稳态。据报道,ERS 是 NEC 新生大鼠自噬的一种潜在诱导剂^[26]。自噬是一种广泛且高度保守的细胞降解过程。LC3 是自噬的关键指标,由于可溶性 LC3 I 型转化为脂质结合型 LC3 II 型是自噬的典型特征,因此使用 LC3 II/I 比率来评估自噬程度^[27]。p62 是一种能与 LC3 结合并被降解的应激蛋白,其含量与自噬水平呈负相关,也被认为是一种自噬程度的标志物^[28]。研究表明,NEC 组 TNF - α 水平高于健康新生儿组,而且随疾病严重程度呈上升趋势,说明其浓度与 NEC 临床分期密切相关^[29]。ERS 可调节肠上皮细胞的炎性反应,持续的 ERS 会诱导细胞凋亡,抑制 ERS 可能对 NEC 的肠道有保护作用^[30,31]。

抑制 ERS 能够减轻细胞凋亡程度和抑制 NEC 的发展^[32]。在严重烧伤小鼠中,抑制 ERS 可减轻烧伤诱导的自噬激活,使肠道通透性减弱,减轻肠道损伤^[33]。因此,以上研究表明,ERS - 自噬通路与肠黏膜屏障功能受损疾病(如 NEC)的发病机制紧密相关,抑制 ERS 诱导的自噬可以减轻 NEC 肠组织的炎性反应。

本实验发现,与对照组比较,抑制组的 TNF - α 、I - FABP、GRP78、ORP150mRNA 表达水平明显降低,LC3 II/I 表达水平下调,p62 表达水平上调,提示炎性细胞因子、ERS 相关标志物表达降低,自噬水平显著下调,诱导组结果明显相反,证明抑制 ERS 通过阻止细胞内自噬激活显著降低 NEC 刺激的炎性细胞因子释放,减轻 NEC 肠上皮细胞的炎性反应,表明抑制 ERS 诱导的自噬可能是 NEC 肠组织损伤的保护机制。所以抑制 ERS - 自噬通路可作为 NEC 肠组织损伤的治疗靶点。

综上所述,抑制 ERS 可减轻 NEC 肠上皮细胞的炎性反应,其作用机制可能与阻断细胞的 ERS - 自噬通路有关。本研究从 ERS 和自噬方面揭示了 NEC 的发病机制,为探索 NEC 的治疗提供了新思路。

利益冲突声明:所有作者均声明不存在利益冲突。

参考文献

- 1 De Bernardo G. Necrotizing enterocolitis: from diagnosis to therapy [J]. *Curr Pediatr Rev*, 2019, 15(2): 67
- 2 Pisano C, Galley J, Elbahrawy M, *et al.* Human breast milk - derived extracellular vesicles in the protection against experimental necrotizing enterocolitis[J]. *J pediatr Surg*, 2020, 55(1): 54 - 58
- 3 Catalina B, Josef N. Necrotizing enterocolitis: long term complications [J]. *Curr Pediatr Rev*, 2019, 15(2): 115 - 124
- 4 Jones IH, Hall NJ. Contemporary outcomes for infants with necrotizing enterocolitis - a systematic review [J]. *J Pediatr*, 2020, 220: 86 - 92, e3
- 5 Stey A, Barnert ES, Tseng CH, *et al.* Outcomes and costs of surgical treatments of necrotizing enterocolitis [J]. *Pediatrics*, 2015, 135(5): e1190 - e1197
- 6 Qiao L, Yan S, Dou X, *et al.* Biogenic selenium nanoparticles alleviate intestinal epithelial barrier damage through regulating endoplasmic reticulum stress - mediated mitophagy [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 3982613
- 7 胡甜,申月明,曾亚. 内质网应激在炎症性肠病免疫调节中的作用[J]. *国际消化病杂志*, 2021, 41(1): 15 - 18
- 8 随何欢,赵海霞,朱丽莎,等. 内质网应激 - 自噬参与葫芦素 E 诱导的结肠癌细胞凋亡[J]. *西部医学*, 2020, 32(11): 1604 - 1607
- 9 Lau E, Lee C, Li B, *et al.* Endoplasmic reticulum stress in the acute intestinal epithelial injury of necrotizing enterocolitis [J]. *Pediatr Surg*

- Int*, 2021, 37(9): 1151 - 1160
- 10 Zhu X, Cui N, Yu L, *et al.* Potential role of endoplasmic reticulum stress is involved in the protection of fish oil on neonatal rats with necrotizing enterocolitis [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 1 - 9
- 11 Chen L, Lv Z, Gao Z, *et al.* Human beta - defensin - 3 reduces excessive autophagy in intestinal epithelial cells and in experimental necrotizing enterocolitis [J]. *Sci Rep*, 2019, 9: 19890
- 12 Tian YX, Mao MJ, Cao XQ, *et al.* Identification and validation of autophagy - related genes in necrotizing enterocolitis [J]. *Front Pediatr*, 2022, 10: 839110
- 13 王国琴,张旭明,王胜超,等. 内质网氧化还原酶 1 α 表达下调对结肠癌细胞增殖、凋亡、迁移和自噬的影响 [J]. *肿瘤*, 2019, 39(5): 325 - 334
- 14 刘晶. 自噬对新生大鼠坏死性小肠结肠炎模型的影响 [D]. 太原: 山西医科大学, 2022
- 15 汪煜鹏. 小鼠小肠上皮隐窝的培养方法与鉴定 [D]. 遵义: 遵义医科大学, 2020
- 16 沈雁,王章流,钟继红,等. 基于 PERK - eIF2 α - NF - κ B 信号通路研究甘草酸苷对小鼠肠上皮细胞内质网应激的保护作用 [J]. *中国现代应用药学*, 2022, 11: 1389 - 1394
- 17 Choi YY. Necrotizing enterocolitis in newborns: update in pathophysiology and newly emerging therapeutic strategies [J]. *Korean J Pediatr*, 2014, 57(12): 505 - 513
- 18 Li Z, Sheng L. Significance of dynamic evolution of tnf - α , IL - 6 and intestinal fatty acid - binding protein levels in neonatal necrotizing enterocolitis [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15(2): 1289 - 1292
- 19 Baregamian N, Song J, Bailey CE, *et al.* Tumor necrosis factor - α and apoptosis signal - regulating kinase 1 control reactive oxygen species release, mitochondrial autophagy and c - Jun N - terminal kinase/p38 phosphorylation during necrotizing enterocolitis [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2009, 2(5): 297 - 306
- 20 Yin M, Li ZH, Wang C, *et al.* Stellate ganglion blockade repairs intestinal mucosal barrier through suppression of endoplasmic reticulum stress following hemorrhagic shock [J]. *Int J Med Sci*, 2020, 17(14): 2147
- 21 Heida F, Hulscher J, Schurink M, *et al.* Intestinal fatty acid - binding protein levels in necrotizing enterocolitis correlate with extent of necrotic bowel: results from a multicenter study [J]. *J Pediatr Surg*, 2015, 50(7): 1115 - 1118
- 22 Cao P, Chen Y, Guo X, *et al.* *Fusobacterium nucleatum* activates endoplasmic reticulum stress to promote crohn's disease development via the upregulation of CARD3 expression [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 106
- 23 Zhang Z, Zhang L, Zhou L, *et al.* Redox signaling and unfolded protein response coordinate cell fate decisions under ER stress [J]. *Redox Biol*, 2019, 25: 101047
- 24 Feng J, Chen Y, Lu B, *et al.* Autophagy activated via GRP78 to alleviate endoplasmic reticulum stress for cell survival in blue light - mediated damage of A2E - laden RPEs [J]. *BMC Ophthalmol*, 2019, 19(1): 1 - 9
- 25 郭晓宇,高宇. 分子伴侣氧调节蛋白 150 在内质网应激相关疾病

中的研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(23): 5995 – 5997

26 Qi Z, Chen L. Endoplasmic reticulum stress and autophagy[J]. Adv Exp Med Biol, 2019, 1206: 167 – 177

27 Guo JM, Xing HJ, Cai JZ, *et al.* H2S exposure – induced oxidative stress promotes LPS – mediated hepatocyte autophagy through the PI₃K/AKT/TOR pathway[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2021, 209: 111801

28 朱晨露, 杜家如, 姚言雪, 等. 沉默 ATG5 及 ATG7 可抑制顺铂介导的耐顺铂睾丸癌细胞的自噬和增殖[J]. 南方医科大学学报, 2021, 41(5): 657 – 663

29 胡利霞, 方红霞. 细胞因子与新生儿坏死性小肠结肠炎的相关性[J]. 中国妇幼健康研究, 2019, 30(1): 19 – 22

30 Li B, Lee C, Chuslip S, *et al.* Intestinal epithelial tight junctions and permeability can be rescued through the regulation of endoplasmic re-

ticulum stress by amniotic fluid stem cells during necrotizing enterocolitis[J]. FASEB J, 2021, 35(1): e21265

31 Li P, Fu D, Sheng Q, *et al.* TUDCA attenuates intestinal injury and inhibits endoplasmic reticulum stress – mediated intestinal cell apoptosis in necrotizing enterocolitis[J]. Int Immunopharmacol, 2019, 74: 105665

32 Afrazi A, Branca MF, Sodhi CP, *et al.* Toll – like receptor 4 – mediated endoplasmic reticulum stress in intestinal crypts induces necrotizing enterocolitis[J]. J Biol Chem, 2014, 289(14): 9584 – 9599

33 Huang Y, Wang Y, Feng Y, *et al.* Role of endoplasmic reticulum stress – autophagy axis in severe burn – induced intestinal tight junction barrier dysfunction in mice[J]. Front Physiol, 2019, 10: 606

(收稿日期: 2022 – 12 – 17)

(修回日期: 2022 – 01 – 24)

(上接第 28 页)

4 Burke DT, Carle GF, Olson MV. Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors[J]. Science, 1987, 236(4803): 806 – 812

5 Shizuya H, Birren B, Kim UJ, *et al.* Cloning and stable maintenance of 300 – kilobase – pair fragments of human DNA in Escherichia coli using an F – factor – based vector[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992, 89(18): 8794 – 8797

6 Spirhanzlova P, Dhorne – Pollet S, Fellah JS, *et al.* Construction and characterization of a BAC library for functional genomics in Xenopus tropicalis [J]. Dev Biol, 2017, 426(2): 255 – 260

7 Gong S, Kus L, Heintz N. Rapid bacterial artificial chromosome modification for large – scale mouse transgenesis[J]. Nat Protoc, 2010, 5(10): 1678 – 1696

8 Luo M, Wang YH, Frisch D, *et al.* Melon bacterial artificial chromosome (BAC) library construction using improved methods and identification of clones linked to the locus conferring resistance to melon Fusarium wilt (Fom – 2)[J]. Genome, 2001, 44(2): 154 – 162

9 Zhao Z, Xie X, Liu W, *et al.* STI PCR: an efficient method for amplification and de novo synthesis of long DNA sequences[J]. Mol Plant, 2022, 15(4): 620 – 629

10 Johnson SJ, Wade – Martins R. A BACwards glance at neurodegeneration: molecular insights into disease from LRRK2, SNCA and MAPT BAC – transgenic mice[J]. Biochem Soc Trans, 2011, 39(4): 862 – 867

11 Zhang Y, Zhang X, O’Hare TH, *et al.* A comparative physical map reveals the pattern of chromosomal evolution between the turkey (Meleagris gallopavo) and chicken (Gallus gallus) genomes[J]. BMC

Genomics, 2011, 12: 447

12 Sato K, Motoi Y, Yamaji N, *et al.* 454sequencing of pooled BAC clones on chromosome 3H of barley[J]. BMC Genomics, 2011, 12: 246

13 Gangalum RK, Jing Z, Nagaoka Y, *et al.* Purification of BAC DNA for high – efficiency transgenesis[J]. Biotechniques, 2011, 51(5): 335 – 337

14 Luo M, Kim H, Kudrna D, *et al.* Construction of a nurse shark (Ginglymostoma cirratum) bacterial artificial chromosome (BAC) library and a preliminary genome survey[J]. BMC Genomics, 2006, 7: 106

15 Ma KY, Yu SH, Du YX, *et al.* Construction of a genomic bacterial artificial chromosome (BAC) library for the prawn macrobrachium rosenbergii and initial analysis of ZW chromosome – derived BAC inserts[J]. Mar Biotechnol (NY), 2019, 21(2): 206 – 216

16 Zhao M, Ma J, Li M, *et al.* Cytochrome P450 enzymes and drug metabolism in humans[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(23): 12808

17 Gaedigk A, Sangkuhl K, Whirl – Carrillo M, *et al.* The evolution of pharmvar[J]. Clin Pharmacol Ther, 2019, 105(1): 29 – 32

18 Xia R, Zhu X, Chen Z, *et al.* Genetic polymorphisms of the drug – metabolizing enzyme cytochrome P450 2A6 in a Tibetan Chinese population[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2018, 11(10): 5024 – 5033

19 Shi X, Zeng H, Xue Y, *et al.* A pair of new BAC and BIBAC vectors that facilitate BAC/BIBAC library construction and intact large genomic DNA insert exchange[J]. Plant Methods, 2011, 7: 33

(收稿日期: 2023 – 01 – 29)

(修回日期: 2023 – 02 – 24)