doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2024.12.001

## ・基础研究・

## EGR1 调控氮能神经元凋亡在糖尿病胃轻瘫发病中的作用\*

 谢 施<sup>1</sup> 谢浩然<sup>2</sup> 余兰婷<sup>1</sup> 陆嘉伟<sup>1</sup> 梅 竹<sup>1</sup> 吴 颖<sup>1</sup> 苏冠豪<sup>1</sup> 李百文<sup>1</sup> (1上海交通大学医学院附属第一人民医院消化科上海市胰腺疾病重点实验室 上海 200080;
 2清华大学附属北京清华长庚医院肝胆胰中心 北京 100084)

摘要 目的:研究糖尿病胃轻瘫(Diabetic gastroparesis, DGP)幽门括约肌组织中氮能神经元损伤的关键基因靶点及其相关机制。方法:采用 SD 大鼠腹腔注射链脲佐菌素构建 I 型糖尿病胃轻瘫模型。通过大鼠幽门括约肌组织转录组测序筛选 DGP 的关键差异性表达基因,并利用免疫组化、免疫印迹等方法验证其在组织中的表达情况。随后,通过小干扰 RNA 敲低 PC12 细胞中该基因的表达,从而探索其具体的作用机制。结果:转录组测序分析提示 DGP 大鼠幽门括约肌组织共存在 808 个差异基因,其中 247 个基因上调,561 个基因下调。其中,"神经活性配体 - 受体相互作用"通路中的早期生长应答基因 1(Early growth response 1, EGR1)的表达发生了显著下调,对照组比造模组的表达量为 1.02± 0.03 vs 0.13± 0.07(P<0.01)。并且,大鼠 DGP 模型的免疫组化、免疫印记等方法均成功验证了其表达的下调。PC12 细胞融减 EGR1 后,神经型一氧化氮合酶(Neuronal nitric oxide synthase, nNOS)及 细胞调亡相关基因 Bcl-2 的表达发生了显著下调。结论:DGP 中 EGR1 可能是引起氮能神经元 nNOS 表达降低和调亡的关键基因,该靶点的发现将为 DGP 的治疗提供新的思路。

关键词:糖尿病胃轻瘫;幽门括约肌痉挛;EGR1;氮能神经元;凋亡 中图分类号:R-33;R573.6;R587.2 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2024)12-2201-06

# The Role of EGR1 in Regulating Nitrergic Neuronal Apoptosis in the Pathogenesis of Diabetic Gastroparesis\*

XIE Ni<sup>1</sup>, XIE Hao-ran<sup>2</sup>, YU Lan-ting<sup>1</sup>, LU Jia-wei<sup>1</sup>, MEI Zhu<sup>1</sup>, WU Ying<sup>1</sup>, SU Guan-hao<sup>1</sup>, LI Bai-wen<sup>1</sup>

(1 Shanghai Key Laboratory of Pancreatic Diseases, Department of Gastroenterology, Shanghai General Hospital,

Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai, 200080, China;

2 Hepatobiliary and Pancreatic Center, Tsinghua Changgung Hospital, Beijing, 100084, China)

**ABSTRACT Objective:** To study the key genetic targets and related mechanisms of nitrergic neuron injury in pyloric sphincter of diabetic gastroparesis (DGP). **Methods:** The Type I diabetic gastroparesis models were established in SD rats through intraperitoneal injection of streptozotocin. Key differentially expressed genes in DGP were screened through transcriptome sequencing of rat pyloric sphincter tissue, and their expression in tissues was verified using qRT-PCR, western blot, and immunofluorescence. Further, the specific mechanism of action of the gene was explored by knocking down their expression in PC12 cells using small interfering RNA (siRNA). **Results:** Transcriptome sequencing analysis indicated the presence of 808 differentially expressed genes (DEGs) in the pyloric sphincter tissues of DGP rats, with 247 genes upregulated and 561 downregulated. Among them, the expression of early growth response 1 (EGR1) in the 'neuroactive ligand-receptor interaction' pathway was significantly downregulated in the pyloric sphincter, with expression levels of  $1.02\pm 0.03$  in the control group versus  $0.13\pm 0.07$  in the model group (P < 0.01). In the DGP models, a significant decrease in the expression of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) and EGR1 protein were validated in the pyloric sphincter muscle using qRT-PCR, western blot, and immunofluorescence. In vitro experiments demonstrated that the knocking down of EGR1 in PC12 cells led to a significant downregulation expression of nNOS and Bcl-2, which would further lead to functional impairment and apoptosis of nitregic neurons. **Conclusions:** EGR1 may be a key gene in DGP that causes reduced expression of nNOS and apoptosis in nitrergic neurons. The identification of this target provides new insights for the treatment of DGP.

Key words: Diabetic gastroparesis; Pyloric spasm; EGR1; Nitrergic neurons; Apoptosis

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R573.6; R587.2 Document code: A Article ID: 1673-6273(2024)12-2201-06

\*基金项目:国家自然科学基金项目(82270568);上海市科技创新计划项目(22Y11907800);

上海市第一人民医院特色临床研究项目(CTCCR-2021B02)

作者简介:谢旎,女,在读硕士研究生,主要研究方向:胃轻瘫的发病机制,E-mail: xiefunny@163.com

<sup>△</sup> 通讯作者:李百文, E-mail: muzibowen@126.com

<sup>(</sup>收稿日期:2024-02-16 接受日期:2024-03-10)

## 前言

胃轻瘫(Gastroparesis,GP)是一种慢性神经肌肉功能障碍 性疾病,其特点为胃排空障碍及内镜下可见的幽门括约肌异常 痉挛<sup>[1]</sup>。临床以餐后饱胀、上腹胀痛以及恶心呕吐为主要表现, 严重者将出现恶质病状态,其全球患病率为 2.68 ‰<sup>[2]</sup>。胃轻瘫 最主要病因为糖尿病<sup>[3]</sup>,然而糖尿病胃轻瘫(Diabetic gastroparesis,DGP)患者幽门括约肌痉挛的机制尚不明确<sup>[4]</sup>,且药物保守 治疗的疗效不佳<sup>[57]</sup>。因此,探索 DGP 患者幽门括约肌痉挛的潜 在机制,对于开发新的药物治疗靶点具有重要意义<sup>[2]</sup>。

DGP 幽门括约肌组织的切片中,氮能神经元的损伤是常见的特征之一,尤其是氮能神经元中神经型一氧化氮合酶(Neuronal nitric oxide synthase, nNOS)的表达下降<sup>[8]</sup>。为探究 DGP 中氮能神经元损失的机制,本研究拟采用 mRNA 测序 (mRNA sequencing, mRNA-seq)分析 DGP 大鼠幽门括约肌组织 中的显著差异性表达基因(Differentially expressed genes, DEGs),探索 DEGs 对氮能神经元的调节作用<sup>[9]</sup>,阐明 DGP 患 者幽门括约肌痉挛相关机制,并实现开发有效治疗方式的目的<sup>[6]</sup>。

## 1 材料与方法

#### 1.1 材料

DGP 患者幽门肌层组织(上海市第一人民医院,伦理号 [2023]293),SD 大鼠(Sprague-Dawley 大鼠,上海市第一人民医 院动物实验中心提供);大鼠肾上腺髓质嗜铬瘤细胞(Pheochromocytoma 12,PC12,上海市第一人民医院消化科实验室保存); 链脲佐菌素(Streptozocin,SZT,Yeasen);illumina HiSeq 测序平 台;EGR1 siRNA(广州锐博生物)、Lipofectamine3000(Invitrogen)、Opti-MEM 培养基(Gibco);TRIzol(湖南艾科瑞生物工程 有限公司)、RNA 逆转录试剂盒、引物设计、PCR SYBR Green (上海新贝生物科技有限公司);RIPA 裂解液、PMSF 蛋白酶抑 制剂、SDS-PAGE 缓冲液、BCA 蛋白测定试剂盒(碧云天);配 胶试剂盒(雅酶);PVDF 膜(Millipore);一抗 EGR1(CST 4154)、nNOS(ABcam, ab1376)、Bcl-2(Proteintech, 68103)、Beta Actin(Proteintech, 20536);EDTA 抗原修复液(pH 9.0)(生工, E673003)。

#### 1.2 DGP 大鼠模型

采用了 12 只 SPF 级 SD 雄性大鼠,周龄均为 3 周,体重分 布在 200-250 g 之间,其饲养温度被严格限定在 25± 1 ℃之间, 可自由进食、饮水,光照模式采用每日 12 个小时的光照和 12 个小时的黑暗。经过 1 周的适应性饲养后,大鼠被随机分配到对 照组和 DGP 造模组。造模组禁食 12 小时后,腹腔注射 55 mg/kg 的 STZ- 柠檬酸钠缓冲液,对照组腹腔注射对应剂量的柠檬酸 缓冲液。STZ 腹腔注射引起大鼠胰岛 β 细胞的不可逆性损害, 导致大鼠的血糖持续升高,以及出现糖尿病三多一少的典型表 现<sup>[10]</sup>。注射完 STZ 后给予充分的水、食物和清洁、干燥的环境。 注射 STZ 后第 3 天,若尾静脉随机血糖 >16.7 mmol/L,则表明 糖尿病模型的成功构建。持续正常饮食饲养 12 周,每周测量血 糖和体重。大鼠胃排空率测定步骤如下:首先,大鼠需禁食 6-12 小时。随后,每只大鼠灌胃 2 mL 的半固体糊。在灌胃 25 分钟 后,使用 CO<sub>2</sub> 窒息法将大鼠处死。通过在腹正中线右旁开 1 cm 的位置迅速打开腹腔,使用止血钳夹闭胃贲门和幽门,将整个 胃取出并拭干,放于称量纸上称得胃总重。随后,将胃的内容物 洗净并拭干,称得胃的净重。胃排空率的计算如下所示:胃排空 率(%)=[1-(胃总重-胃净重)/半固体糊重量]× 100%。

#### 1.3 转录组测序分析

在胃排空实验后,收集两组大鼠的幽门括约肌组织,用 PBS 冲洗后迅速置于液氮中,提取幽门括约肌组织中的总 RNA。转录组测序分析由 GENEFUND Biology 完成。首先,将 带有 polyA 尾巴的 RNA 片段打断为 200-300 bp,然后转录成 cDNA,实现 mRNA 捕获。随后,通过 3'端加 A 碱基修复 DNA 末端后,PCR 富集文库片段构建高通量文库。在 Illumina HiSeq/NextSeq 平台上,对经 Agilent 2100 分析仪质控合格后的 样本进行测序。原始数据经去除接头及污染后,然后通过 HISAT2 工具映射到大鼠(Rattus norvegicus, Rnor 6.0)参考基 因组序列。采用 edgeR 包分析表达谱中的差异表达分子<sup>[11]</sup>。以 llog<sub>2</sub> Fold Change|>1 且 P<0.05 为标准,鉴定出 DEGs。随后,通 过基因本体(Gene ontology, GO)和京都基因和基因组百科全 书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)对 DEGs 进行富集分析。

#### 1.4 免疫组化

首先采用4%多聚甲醛溶液对幽门括约肌组织进行固定。 随后,将固定后的样本进行脱水和石蜡包埋,并在60℃条件下 进行90分钟的烤片。使用EDTA进行抗原修复后,在4℃条件 下孵育EGR1抗体(1:100浓度)过夜,然后在室温条件下避光 孵育二抗。完成后用中性树脂对切片进行封片,以确保样本的 稳定性和保存。最后,使用显微镜对封片后的样本进行成像,观 察并记录实验结果。

#### 1.5 细胞转染

体外模型采用 PC12 细胞模型, PC12 细胞具有典型的神经 元形态和功能特征。由于其易于培养和操纵的优点, 在神经生 物学研究得到广泛应用<sup>[12]</sup>。在 6 孔板中接种对数生长周期的 PC12 细胞, 在细胞密度为 50 %时进行转染操作。在转染体系 的制备过程中,将 2 μL lipofectamine3000、2 μL 小干扰 RNA 分别与 125 μL Opti-MEM 培养基充分混合, 室温放置 5 分钟 后将二者混匀, 并继续孵育 15 分钟。六孔板中的细胞更换无血 清培养基后, 加入配制好的转染试剂, 12 小时后更换含血清培 养基, 随后继续培养 24 小时。

#### 1.6 免疫印迹试验

RIPA 提取组织、细胞蛋白后(组织行匀浆处理),利用 BCA 法对样本进行浓度定量。将样本与 Loading Buffer 按 1:4 的比例混合,并在 100 ℃下加热 10 分钟,以确保蛋白样本充分 变性。以 30 µg 蛋白/泳道量上样后,进行电泳,转膜以及封闭 等操作。完成上述步骤后,将条带置于一抗中,4 ℃的环境下孵 育 12 小时。随后,将条带置于二抗(1:20000 稀释比)中室温孵 育 1 小时,最后利用 ECL 超敏发光液进行显影。

## 1.7 实时定量聚合酶链反应(qRT-PCR)

DGP 患者及大鼠的幽门组织样本需经过充分的研磨,随后在上述组织及 PC12 细胞中加入 Trizol 以提取总 RNA,采用 NanoDrop 仪测定 RNA 浓度,并调整 RNA 浓度为 200-1000ng/µL。将 1000 ng RNA 样本逆转录,生成 cDNA。随后加入 SYBR

Green 及引物,采用荧光定量 PCR 检测仪 (Q6,Quantstudio 6 flex)进行 qRT-PCR,计算目标基因的相对表达量。

## 1.8 统计学分析

结果统计采用 GraphPad Prism 9.5 软件进行。差异基因表达分析利用 edgeR package,筛选条件为  $|\log_2$  Fold Change| > 1 及 P<0.05。t 检验用于比较两组间的均数差异。在所有统计分析中,\*表示显著性水平为 P<0.05。结果以均值±标准误的形式呈现。

## 2 结果

#### 2.1 DGP 模型大鼠成功构建

一次性腹腔注射 55 mg/kg STZ 后, DGP 组大鼠的平均血 糖浓度较对照组显著升高,且血糖浓度均超过 16 mmol/L,第 12 周的平均血糖浓度显著高于对照组(32.26± 0.66 vs 6.50± 0.19 mmol/L, P<0.01,图 1A)。DGP 组大鼠的体重增长缓慢,而 对照组体重持续上升,在 12 周时,对照组与 DGP 组大鼠的平 均体重出现显著性差异(643.20± 32.61 vs 326.00± 18.74 g, P<</li>
0.01,图 1B)。固体胃排空实验结果显示对照组的胃排空率显著 高于 DGP 大鼠组(74.64± 6.52 vs 38.58± 8.94%, P<0.01,图 1C),表明糖尿病胃轻瘫模型成功建立。



Note: A. Rat blood glucose changes; B. Changes in rat body weight; C. Solid gastric emptying test.

### 2.2 转录组测序分析差异表达基因

转录组测序数据分析结果如火山图所示(图 2A),筛选出 808 个 DEGs,包括 247 个显著上调和 561 个显著下调的基因。 基于 GO 功能富集分析,这些 DEGs 被发现富集于 4993 个 GO 术语中,特别是在"细胞成分"(Cellular component, CC)类别 内,"神经元投射终点"通路是显著富集的主要通路之一(图 2B)。KEGG 富集分析中"神经活性配体 - 受体相互作用"通路包含了最多差异基因(图 2C)。基于以上富集结果,本研究特别关注了 3 个关键的差异基因,包括早期生长应答基因 1(Early growth response 1, EGR1)、双特异性磷酸酶 2(Dual specificity phosphatase 2, DUSP2)和 C-C 模体趋化因子配体 5(C-C motif chemokine ligand 5, CCL5)。测序数据中以上基因的表达量分析显示,它们在造模组中均显著下调(EGR1:16.53± 3.45 vs 6.21± 1.81, P<0.001;DUSP2:0.54± 0.11 vs 0.17± 0.05, P< 0.05; CCL5:0.84± 0.24 vs 0.15± 0.07, P<0.05, 图 2D)。

#### 2.3 EGR1 在 DGP 大鼠模型中的表达情况

DGP 大鼠模型的 qRT-PCR 结果提示,EGR1、DUSP2 及 CCL5 这三个差异表达基因的 mRNA 水平均发生了显著下降, 其中 EGR1 下降最为显著 (EGR1:1.02± 0.03 vs 0.13± 0.07, P<0.01,图 3A)。IHC 及 Western blot 实验进一步验证了 DGP 大鼠模型中 EGR1 蛋白的表达水平发生了显著下降 (图 3B、 C),半定量分析提示 EGR1 蛋白表达下降约 46.1%(图 3D)。

## 2.4 EGR1 对神经元 nNOS 表达的影响

本研究对氮能神经元细胞所分泌的 nNOS 及凋亡相关指标 Bcl-2 与 EGR1 表达降低的相关进行了进一步探索。DGP 患

者的幽门组织 qRT-PCR 结果提示, nNOS 的 mRNA 表达水平 发生了显著地下调(nNOS:0.99± 0.09 vs 0.26± 0.03, *P*<0.01), 而胆碱乙酰转移酶(Choline Acetyltransferase, ChAT)的 mRNA 水平无显著变化 (ChAT:1.00± 0.01 vs 0.62± 0.37, *P*>0.05, 图4)。

DGP 大鼠模型幽门括约肌组织的 qRT-PCR 提示,nNOS 和 Bcl-2 的 mRNA 表达水平发生了显著地下调(nNOS:0.98± 0.07 vs 0.15± 0.05,P<0.01;Bcl-2:0.97± 0.07 vs 0.45± 0.03, P<0.05),而胆碱乙酰转移酶(Choline Acetyltransferase, ChAT) 的 mRNA 水平无显著变化(图 5A)。WB 结果提示,EGR1 表达 降低伴随着 nNOS 和凋亡相关蛋白 Bcl-2 的显著性表达下调 (nNos:1.251± 0.16 vs 0.72± 0.02,P<0.05;Bcl-2:0.93± 0.04 vs 0.48± 0.01,P<0.01,图 5B、C)。

### 2.5 敲低 EGR1 将减少 PC12 细胞 nNOS、Bcl-2 的表达

在体外模型中,本研究通过 siRNA 技术成功敲低了 PC12 细胞中 EGR1 的表达(图 6A、B)。与此同时,当 EGR1 表达下调 后,RNA 水平及蛋白水平的 nNOS、Bcl-2 的表达均发生了显著 性下调(图 6A、B),分别下降了约 38.3 %、31.0 %(图 6C)。提示 EGR1 表达降低可以引起 nNOS 蛋白的表达下调,并介导 Bcl-2 蛋白的表达下调从而引发 PC12 细胞的凋亡。

## 3 讨论

糖尿病是胃轻瘫最主要病因<sup>13</sup>,糖尿病患者伴胃轻瘫症状 和诊断往往将伴随更差的预后<sup>13</sup>。目前,胃轻瘫药物治疗的效 果尚不理想<sup>16</sup>。本研究通过转录组测序,在 DGP 大鼠模型的幽





D. EGR1, DUSP2及CCL5差异基因mRNA表达量。 Fig.2 Rat tissue transcriptome sequencing data analysis

Note: A. Volcano plot of differentially expressed genes in rat tissue mRNA-seq; B. Bar chart of GO enrichment analysis for differentially expressed genes; C. Results of KEGG pathway enrichment analysis; D. mRNA expression levels of differential expressed genes.

门括约肌中筛选了多个差异表达基因。并对差异基因进行基因 功能富集,发现集中在"神经活性配体-受体相互作用"、"神 经元投射终点"等通路<sup>[14]</sup>。基于这些富集分析的结果,其中 EGR1、DUSP2和CCL5三个基因主要存在于神经元凋亡相关 信号通路,提示它们可能在神经调控过程中扮演着关键角色<sup>[15]</sup>。 本研究特别关注到EGR1的表达水平发生了显著降低,提示其 可能通过影响肌间神经病变造成 DGP 的发生。

幽门部肌间神经包括大量的氮能神经元<sup>[16,17]</sup>,其主要作用 是通过 nNOS 在氮能神经元中合成一氧化氮(Nitric Oxide, NO)神经递质,从而调控幽门舒张。在 DGP 患者的组织切片 中,往往能观察到氮能神经元的缺失<sup>[18,19]</sup>。Elim 等人研究表明氮 能神经元数量减少主要归因于氮能神经元的凋亡<sup>[2021]</sup>。本研究 在患者的临床幽门组织中同样验证了 nNOS 表达降低。该基因 的表达下调将引起氮能神经元失去对幽门括约肌的调控,进而 破坏了收缩与舒张的平衡,造成异常收缩。因此,本研究进一步 探究了 EGR1 的表达是否与 nNOS 表达减少相关。

EGR1 蛋白也被称为 EGR-1、NEFI-A、Zif 268 等<sup>[22]</sup>,具有调 控细胞增殖、生长和分化等作用<sup>[23-25]</sup>。这表明在不同的疾病类型 中,EGR1 可能以不同的方式调控神经元的凋亡。EGR1 可通过 促进 p53、Bim 转录从而诱导海马神经元与小脑颗粒神经元的 凋亡<sup>[26,27]</sup>;但也有研究表明 EGR1 可通过促进 Bcl-2 的转录抑制 神经母细胞瘤细胞、神经胶质瘤细胞的凋亡<sup>[27,28]</sup>。EGR1 表达下 降可能减弱细胞对凋亡刺激的抵抗能力,从而影响细胞的功能 和生存。这些文献结果提示 EGR1 在神经元细胞中发挥着调控 神经元生存、功能和凋亡的作用<sup>[29]</sup>。本研究进一步通过研究验 证 EGR1 的表达下降是否会影响神经元中 nNOS 的表达。体外 实验模型验证, 敲低 PC12 细胞中 EGR1 的表达后,细胞 nNOS、Bcl-2 的 mRNA 及蛋白表达水平均发生显著下调。这一 结果提示,EGR1 可能参与调控氮能神经元的功能与凋亡。此 外,有文献提示 EGR1 有丰富的转录因子功能<sup>[30,31]</sup>。nNOS 启动 子序列、Bcl-2 启动子序列中均存在着 EGR1 的结合序列,E-GR1 的表达下调可能导致氮能神经元内抗凋亡基因 Bcl-2 和 nNOS 的转录受损,进而引起氮能神经元凋亡及 nNOS 表达下 调,最终导致幽门括约肌的痉挛,该部分研究有待深入验证。

因此,本研究结果提示 EGR1 在 DGP 发病机制中可能发 挥着关键作用,其作用可能与氮能神经元的凋亡相关,将为探 索新的 DGP 治疗策略提供了重要的研究思路,然而,EGR1 具 体的转录调控的分子生物学机制尚需进一步深入研究。



图 3 差异基因在胃排空正常大鼠和 DGP 大鼠中的表达水平

注:A. qRT-PCR 检测糖尿病胃轻瘫大鼠和正常对照组幽门肌层之间 EGR1、DUSP2 和 CCL5 基因的 mRNA 表达水平;B. 免疫组化分析 EGR1 在对 照组和 DGP 大鼠模型中的表达情况;C. Western blot 检测糖尿病胃轻瘫大鼠幽门肌层中的 EGR1 的蛋白表达水平;D. EGR1 蛋白表达定量分析。 Fig.3 Expression levels of differential genes in rats with normal gastric emptying and DGP rats

Note: A. qRT-PCR detection of mRNA expression levels of EGR1, DUSP2, and CCL5 genes in the pyloric muscle layer between diabetic gastroparesis group and normal control group; B. Immunohistochemical examination of EGR1 expression; C. Western blot of EGR1 protein; D. Quantitative analysis of EGR1 protein expression.

 1.5
 Control DGP

 1.0
 \*\*\*

 1.0
 0.5

 0.5
 0.5

 0.0
 ChAT

 B 4 氮能神经元、胆碱能神经元特异性指标 mRNA 在临床患者中的表达情况

Fig.4 Expression of nitrergic and cholinergic neuron-specific marker mRNAs in clinical patients

#### 参考文献(References)

- Martinek J, Hustak R, Mares J, et al. Endoscopic pyloromyotomy for the treatment of severe and refractory ga stroparesis: a pilot, randomised, sham-controlled trial[J]. Gut, 2022, 71(11): 2170-2178.
- [2] Ye Y, Yin Y, Huh SY, et al. Epidemiology, Etiology, and Treatment of Gastroparesis: Real-World Evidence From a Large US National Claims Database[J]. Gastroenterology, 2022, 162(1): 109-21.e5.
- [3] Grover M, Farrugia G, Stanghellini V. Gastroparesis: a turning point in understanding and treatment[J]. Gut, 2019, 68(12): 2238-2250.
- [4] Abdelfatah MM, Noll A, Kapil N, et al. Long-term Outcome of Gastric Per-Oral Endoscopic Pyloromyotomy in Treatment of Gastroparesis [J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2021, 19(4): 816-824.
- [5] Bharucha AE, Kudva YC, Prichard DO. Diabetic Gastroparesis [J]. Endocrine Reviews, 2019, 40(5): 1318-1352.
- [6] Guo H, Fang C, Huang Y, et al. Treatment of diabetic gastroparesis with botulinum toxin injection guided by endoscopic ultrasound in a patient with type 1 diabetes: the first report [J]. Acta Diabetol, 2017,



注: A. qRT-PCR 检测 DGP 大鼠中 nNOS、ChAT 和 Bcl-2 的 mRNA 表达; B, C. Western blot 检测糖尿病胃轻瘫大鼠幽门括约肌 nNOS、Bcl-2 蛋白 表达情况及定量分析图。

#### Fig.5 Expression of neurons and apoptotic-related proteins in DGP rats

Note: A. qRT-PCR analysis of mRNA expression of nNOS, ChAT and Bcl-2 in diabetic gastroparesis rats; B. Western blot analysis of the expression levels and quantitative analysis of nNOS and Bcl-2 proteins in the pyloric sphincter of diabetic gastroparesis rats.



图 6 EGR1 表达水平变化对 PC12 细胞的影响

注: A, B. 敲减 EGR1 后 PC12 细胞内 nNOS 和 Bcl-2 的 mRNA和蛋白表达变化; C. EGR1、nNOS 和 Bcl-2 蛋白表达定量分析图

Fig. 6 The impact of changes in EGR1 protein expression levels on PC12 cells

Note: A, B. Changes in mRNA and protein levels of nNOS and Bcl-2 in PC12 cells following the knockdown of EGR1; C. Quantitative analysis of EGR1, nNOS, and Bcl-2 protein expression.

54(5): 509-511.

- [7] Krishnasamy S, Abell TL. Diabetic Gastroparesis: Principles and Current Trends in Management [J]. DIABETES THERAPY, 2018, 9: S1-S42.
- [8] Grover M, Farrugia G, Lurken MS, et al. Cellular Changes in Diabetic and Idiopathic Gastroparesis [J]. Gastroenterology, 2011, 140 (5): 1575-U296.
- [9] Gao F, Hayashi Y, Saravanaperumal SA, et al. Hypoxia-Inducible Factor 1alpha Stabilization Restores Epigenetic Control of Nitric Oxide Synthase 1 Expression and Reverses Gastroparesis in Female Diabetic Mice[J]. Gastroenterology, 2023, 165(6): 1458-1474.
- [10] Furman BL. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats[J]. Curr Protoc, 2021, 1(4): e78.
- [11] Stark R, Grzelak M, Hadfield J. RNA sequencing: the teenage years[J]. Nat Rev Genet, 2019, 20(11): 631-656.
- [12] Balon K, Wiatrak B. PC12 and THP-1 Cell Lines as Neuronal and Microglia Model in Neurobiol ogical Research [J]. Applied Sciences, 2021, 11(9): 3729.
- [13] Hyett B, Martinez FJ, Gill BM, et al. Delayed radionucleotide gastric emptying studies predict morbidity in diabetics with symptoms of gastroparesis[J]. Gastroenterology, 2009, 137(2): 445-452.
- [14] Hansen JY, Shafiei G, Markello RD, et al. Mapping neurotransmitter

systems to the structural and functional organization of the human neocortex[J]. Nat Neurosci, 2022, 25(11): 1569-1581.

- [15] Yuan J, Ofengeim D. A guide to cell death pathways[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2023[Epub ahead of print].
- [16] Mussa BM, Soo d S, Verberne AJ. Implication of neurohormonal-coupled mechanisms of gastric emptying and pancreatic secretory function in diabetic gastroparesis [J]. World J Gastroenterol, 2018, 24(34): 3821-3833.
- [17] Goyal RK, Guo Y, Mashimo H. Advances in the physiology of gastric emptying[J]. Neurogastroenterol Motil, 2019, 31(4): e13546.
- [18] Jamali R, Mohseni S. Hypoglycaemia causes degeneration of large myelinated nerve fibres in the vagus nerve of insulin-treated diabetic BB/Wor rats[J]. Acta Neuropathol, 2005, 109(2): 198-206.
- [19] Grover M, Dasari S, Bernard CE, et al. Proteomics in gastroparesis: unique and overlapping protein signatures in diabetic and idiopathic gastroparesis [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2019, 317 (5): G716-g26.
- [20] Cellek S, Foxwell NA, Moncada S. Two phases of nitrergic neuropathy in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. Diabetes, 2003, 52(9): 2353-2362.
- [21] Zhang CM, Huang X, Lu HL, et al. Diabetes-induced damage of gastric nitric oxide neurons mediated by P2X7R in diabetic mice[J].
   Eur J Pharmacol, 2019, 851: 151-160. (下转第 2273 页)

- [10] 黃翠,李进.康柏西普联合激光光凝治疗视网膜静脉阻塞合并黄斑水肿的临床效果及对视力水平的影响 [J].实用老年医学,2020, 34(4):377-380.
- [11] 刘法,郝静,陈志杰.视网膜中央静脉阻塞伴发黄斑水肿患者房水 中 miR-191、p21 表达及意义[J]. 山东医药, 2022, 62(10): 80-83.
- [12] 李奕萍,张新.玻璃体腔注射雷珠单抗联合视网膜激光光凝对视网膜静脉阻塞黄斑水肿的疗效及对脉络膜厚度和炎症因子的影响[J].临床与病理杂志,2023,43(2):250-257.
- [13] 季红英,杨林青,郭黎霞,等.视网膜激光联合球内注射雷珠单抗 治疗视网膜静脉阻塞黄斑水肿对黄斑区微血管结构变化的影响 [J].中国医师杂志,2021,23(10):1555-1558.
- [14] 张韫洁,李新章,索南措,等.康柏西普联合视网膜激光光凝对缺血型视网膜中央静脉阻塞患者球结膜微循环指标和血管内皮功能的影响[J].现代生物医学进展,2021,21(22):4368-4371,4386.
- [15] 张香闺, 宋艳萍, 黄珍, 等. 康柏西普治疗新生血管性老年性黄斑 变性中1型黄斑新生血管合并不同类型视网膜色素上皮脱离的 疗效观察[J]. 中华眼底病杂志, 2022, 38(3): 217-224.
- [16] 张婷,孙湛,白晓宁. 通络驻景丸联合康柏西普治疗年龄相关性黄 斑变性的疗效及对 CMT 和视力的影响 [J]. 海南医学, 2023, 34 (18): 2670-2673.
- [17] 乔灵飞,姜波,史春生.单次康柏西普注射对视网膜分支静脉阻塞 继发黄斑水肿病人黄斑区视网膜血流参数的影响 [J].安徽医药, 2021,25(4):818-820.

(上接第 2206 页)

- [22] Fagerberg L, Hallström BM, Oksvold P, et al. Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics [J]. Mol Cell Proteomics, 2014, 13(2): 397-406.
- [23] Hu YT, Chen XL, Huang SH, et al. Early growth response-1 regulates acetylcholinesterase and its relation with the course of Alzheimer's disease[J]. Brain Pathol, 2019, 29(4): 502-512.
- [24] Li Y, Xue M, Hu F, et al. Klotho prevents epithelial-mesenchymal transition through Egr-1 downregulation in diabetic kidney disease[J]. BMJ Open Diabetes Res Care, 2021, 9(1): e002038.
- [25] Ao H, Liu B, Li H, et al. Egr1 mediates retinal vascular dysfunction in diabetes mellitus via promoting p53 transcription [J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(5): 3345-3356.
- [26] Wang YL, Zhang Y, Cai DS. Dexmedetomidine Ameliorates Postoperative Cognitive Dysfunction via the MicroRNA-381-Mediated EGR1/p53 Axis [J]. Mol Neurobiol, 2021, 58 (10): 5052-5066.
- [27] Xie B, Wang C, Zheng Z, et al. Egr-1 transactivates Bim gene

- [18] 王茜,赵晓霞,吴娟,等. 雷珠单抗康柏西普玻璃体注射联合 AGV 治疗新生血管性青光眼的效果及对房水 VEGF IL-6 水平的影响 [J]. 河北医学, 2021, 27(5): 789-794.
- [19] 郭宓,边红霞,边梦婷,等.康柏西普治疗不同 OCT 分型糖尿病性 黄斑水肿对视网膜椭圆体带影响 [J].临床眼科杂志,2023,31(2): 121-125.
- [20] 丁雪菲,李秋明,赵秋朴,等.抗 VEGF 或抗炎治疗对视网膜静脉 阻塞继发不同类型黄斑水肿的短期疗效比较 [J]. 国际眼科杂志, 2022, 22(3): 500-504.
- [21] 姜旭光,苏争宏.康柏西普不同用药方案治疗湿性年龄相关性黄斑 变性的疗效及安全性对照研究 [J]. 检验医学与临床, 2023, 20(8): 1170-1172, 1184.
- [22] 单田慧, 俞嘉宣, 刘春莉, 等. 玻璃体腔注射康柏西普联合全视网 膜激光光凝治疗不同分期增殖性糖尿病视网膜病变[J]. 国际眼科 杂志, 2023, 23(8): 1242-1249.
- [23] 徐跃里,蔡旻贇,石晶琳,等.改良眼底激光光凝合康柏西普治疗 增殖性糖尿病视网膜病变的效果及对视力水平、黄斑区血流密度 的影响[J].现代生物医学进展,2023,23(7):1283-1287.
- [24] 赵珂珂,姚腾腾,杨帅,等. 经巩膜视网膜下液引流及冷凝术联合 康柏西普治疗3期外层渗出性视网膜病变疗效观察[J]. 海军军医 大学学报, 2022, 43(7): 832-836.
- [25] 王建伟, 接传红, 陶永健, 等. 消肿颗粒联合康柏西普治疗 DME 的 疗效观察[J]. 中国中医眼科杂志, 2023, 33(5): 412-417.

expression to promote neuronal apoptosis [J]. J Neurosci, 2011, 31 (13): 5032-5044.

- [28] Zuo Z, Wang Y, Huang Y. Isoflurane preconditioning protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against in vitro simulated ischemia-reperfusion through the activation of extracellular signal-regulated kinases pathway [J]. Eur J Pharmacol, 2006, 542 (1-3): 84-91.
- [29] Maurya VK, Ying Y, Lanza DG, et al. A CRISPR/Cas9-engineered mouse carrying a conditional knockout allele for the early growth response-1 transcription factor[J]. Genesis, 2023, 61(3-4): e23515.
- [30] Shan J, Dudenhausen E, Kilberg MS. Induction of early growth response gene 1 (EGR1) by endoplasmic reticulum stress is mediated by the extracellular regulated kinase (ERK) arm of the MAPK pathways [J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2019, 1866(3): 371-381.
- [31] Kim JW, Ko MJ, Gonzales EL, et al. Social support rescues acute stress-induced cognitive impairments by modulating ERK1/2 phosphorylation in adolescent mice[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 12003.