

CNR1激活FIS1促进线粒体裂解抑制 骨肉瘤细胞恶性进展

王良铭 张小路*

(福建医科大学附属第二医院骨科, 泉州 362000)

摘要 该文探讨了大麻素受体1(cannabinoid receptor-1, CNR1)在骨肉瘤细胞恶性进展中的作用机制。通过生信分析CNR1在肿瘤组织中表达水平高低和远期生存率变化;采用CNR1过表达慢病毒感染骨肉瘤细胞;通过CCK-8、划痕实验、克隆实验、Transwell细胞侵袭实验和流式细胞凋亡实验检测骨肉瘤细胞增殖、集落形成和侵袭能力变化以及细胞凋亡水平;使用透射电镜、Mito-SOX探针和免疫印迹检测线粒体形态和功能变化;通过裸鼠荷瘤实验验证CNR1高表达骨肉瘤细胞在体内的生长情况。结果显示CNR1在骨肉瘤组织中表达上调,并且CNR1高表达组患者的远期生存率显著高于低表达组;免疫印迹证实了慢病毒感染成功地诱导了骨肉瘤细胞系CNR1高表达;CNR1高表达显著抑制了骨肉瘤细胞增殖、集落形成和侵袭,并诱导了骨肉瘤细胞凋亡;CNR1激活了线粒体裂解蛋白1(mitochondrial fission 1 protein, FIS1)从而引起了线粒体过度裂解,诱发了线粒体途径凋亡;在载瘤裸鼠体内,CNR1过表达通过促进线粒体途径凋亡从而抑制骨肉瘤细胞恶性进展。

关键词 线粒体分裂; CNR1; 凋亡; 骨肉瘤; 远期生存率

Activation of FIS1 by CNR1 Promotes Mitochondrial Cleavage to Inhibit Malignant Progression of Osteosarcoma

WANG Liangming, ZHANG Xiaolu*

(Department of Orthopedics, the Second Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Quanzhou 362000, China)

Abstract The article explored the mechanism of CNR1 on the malignant progression of osteosarcoma cells. The changes of high and low CNR1 expression and long-term survival in tumor tissues were analyzed by bio-analysis; CNR1 overexpression lentivirus was used to infect osteosarcoma cells; CCK-8, scratch assay, clonogenic assay, Transwell cell invasion assay and flow apoptosis assay were used to detect the changes of osteosarcoma cells' proliferation, colony formation and invasion ability, as well as the level of apoptosis; transmission electron microscopy was used, MitoSOX probe and immunoblotting to detect changes in mitochondrial morphology and function; and nude mice loaded tumor assay to verify the growth of CNR1 high-expression osteosarcoma cells *in vivo*. The results showed that CNR1 expression was up-regulated in osteosarcoma tissues, and the long-term survival rate of patients in the group with high CNR1 expression was significantly higher than that in the group with low CNR1 expression; the immunoblotting confirmed that lentivirus infection successfully induced the high CNR1 expression in osteosarcoma cell lines; the high expression of CNR1 significantly inhibited osteosarcoma cells' proliferation, colony formation, and invasive ability and induced osteosarcoma cells' apoptosis; CNR1 activated FIS1 thereby caus-

收稿日期: 2024-10-18

接受日期: 2024-11-21

福建医科大学启航基金(批准号: 2020QH1114)资助的课题

*通信作者。Tel: 13788861110, E-mail: 729929014@qq.com

Received: October 18, 2024

Accepted: November 21, 2024

This work was supported by the Fujian Medical University Qihang Fund (Grant No.2020QH1114)

*Corresponding author. Tel: +86-13788861110, E-mail: 729929014@qq.com

ing excessive mitochondrial cleavage and inducing mitochondrial pathway apoptosis; in tumor-bearing nude mice, CNR1 overexpression inhibited malignant progression of osteosarcoma cells by promoting mitochondrial pathway apoptosis.

Keywords mitochondrial fission; CNR1; apoptosis; osteosarcoma; long-term survival

骨肉瘤(osteosarcoma, OS)是一种侵袭性骨癌,起源于间充质来源的骨祖细胞^[1-2]。流行病学资料显示,OS的年发病率约为3例/百万人,占有恶性肿瘤的0.2%^[3-4]。新辅助化疗联合手术治疗可显著提高OS患者5年总生存率(达到60%~70%)^[5]。然而,在过去的30年里,学者们在改善骨肉瘤患者生存结果方面取得的进展有限,OS的疗效一直停滞不前^[6-7]。因此,研究驱动OS进展的分子机制、识别治疗靶点和开发有效药物至关重要。

大麻素受体1(cannabinoid receptor-1, CNR1)是内源性大麻素系统的重要配体之一,参与调控细胞对各种内源性和外源性兴奋剂的反应^[8]。CNR1不仅在脑组织中表达,还在免疫细胞、骨骼和肌肉等组织中发挥重要作用^[9]。迄今为止,人们对CNR1在运动系统发育和疾病中的作用和影响知之甚少。

当前,KALKAN等^[10]证明了2-花生四烯酸甘油激活CNR1是促进卫星细胞和成肌细胞增殖、自我更新并阻止它们向成熟肌管分化的主要机制。还有研究发现,内源性大麻素的过量产生引起CNR1和相关信号的失调,导致杜氏肌营养不良症引起的骨骼肌组织不可逆的退化^[11]。其他研究表明,CNR1在大鼠和人肌肉细胞中的过度激活会负向调节葡萄糖和脂肪酸代谢^[12]。因此,基于其多方面的生物效应,探寻CNR1在骨骼疾病中的作用机制是一个非常有价值的研究方向。在骨肉瘤方面,尚未有CNR1相关的文献报道,其作用机制有待进一步揭示,因此本实验以CNR1过表达的骨肉瘤细胞为研究对象,探究CNR1在骨肉瘤发生发展过程中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

CNR1过表达慢病毒购自上海吉满生物科技有限公司; CNR1抗体(货号ab259323)、Bax抗体(货号ab32503)、Bcl2抗体(货号ab182858)、Bcl-xl抗体(货号ab32370)、FIS1抗体(货号ab229969)、MFN1抗体(货号ab221661)购自英国Abcam公司; Cleaved Caspase-9抗体(货号9509)、DRP1抗体(货

号8570)、MFN2抗体(货号ab124773)购自美国Cell Signaling Technology公司; DMEM高糖培养基(货号11965118)、胎牛血清(FBS)(货号A5256701)、CCK-8试剂盒(货号C7026)、TUNEL试剂盒(货号C10618)购自美国ThermoFisher Scientific公司; 结晶紫染色液(货号C0121)、MitoSOX荧光探针(货号S0061S)购自上海碧云天生物科技有限公司; Annexin V-APC/7-AAD双染细胞凋亡检测试剂盒(货号KGA1106)购自江苏凯基生物科技有限公司; 倒置荧光显微镜(型号IX51)购自日本Olympus公司; 流式细胞仪(型号Citole LX)购自美国Beckman Coulter公司; 透射电子显微镜(型号Hitachi HT-7800)购自日本Hitachi High-Tech公司。

1.2 细胞培养和慢病毒转染

K7M2/MG63/143B骨肉瘤细胞系培养在含10% FBS和1%双抗的DMEM高糖培养基中,使用0.25%胰酶进行消化(37 °C、3 min),按照1:5比例进行传代培养,细胞置于专用的冻存液中长期储存。

将待转染的骨肉瘤细胞置于24孔板中,待细胞密度达到60%~70%,分别添加空载体对照慢病毒(OE-Ctrl)和CNR1过表达慢病毒(OE-CNR1)至 1×10^8 TU/mL浓度,感染24 h后换入新鲜培养基。感染后48~72 h,更换含1.6 μg/mL浓度嘌呤霉素的新鲜完全培养液,筛选稳定转导的细胞株。

1.3 免疫印迹

将骨肉瘤细胞种植在6孔板中,待细胞密度达到80%~90%,向各孔中添加2 mL RIPA以裂解细胞,4 °C、12 000 r/min离心15 min抽提出细胞裂解液中的总蛋白。使用BCA法对蛋白质进行定量后使用缓冲液进行配平,随后进行电泳上样。电泳至条带跑出液面低点后进行转膜操作。将PVDF膜使用专用的封闭液室温封闭1 h,添加相对应的一抗(稀释比例1:1 000)在4 °C摇床过夜放置。使用相匹配的二抗(稀释比例1:5 000)室温孵育1 h,随后在显影液作用下进行曝光成像。

1.4 CCK-8细胞活性检测

将骨肉瘤细胞种植于96孔板中,待细胞密度达到60%~70%,使用排枪向每个孔中添加CCK-8溶液

10 μL , 继续在37 °C细胞培养箱孵育4 h, 随后使用酶标仪在450 nm波长处测定各孔的吸光度(D)值。

1.5 划痕实验

将骨肉瘤细胞种植于6孔板中, 待细胞密度达到60%~70%, 使用100 μL 的移液器枪头在培养皿底部进行均匀划痕, 随后使用PBS清洗2遍后添加培养基, 36 h后在显微镜下拍照观测划痕面积的变化。

1.6 克隆形成实验

以200个/孔的密度将骨肉瘤细胞种植于6孔板中, 细胞种植9~12天后在肉眼和显微镜下观测骨肉瘤细胞形成的集落, 待肉眼可测时添加结晶紫染色液进行染色, 15 min后拍照观察。

1.7 Transwell细胞侵袭实验

使用基质胶铺在Transwell细胞小室的上侧, 待基质胶凝固后将骨肉瘤细胞种植于Transwell细胞小室的上侧, 在下侧添加含有20% FBS浓度的高糖培养基。24 h后取出Transwell细胞小室, 去除上侧的基质胶后进行结晶紫染色, 随后用显微镜对Transwell细胞小室下侧侵袭的骨肉瘤细胞进行拍照。

1.8 流式细胞凋亡检测

将骨肉瘤细胞种植于6孔板中, 待细胞密度达到80%~90%, 使用不含胰酶的专用消化液在37 °C细胞培养箱中消化3 min, 1 300 r/min离心3 min后重悬, 在1.5 mL离心管中加入Annexin V-APC/7-AAD染液, 避光4 °C孵育15 min后使用PBS洗去染液, 随后进行滤网过滤后在流式细胞仪中上样检测。

1.9 透射电镜

将骨肉瘤细胞种植于10 cm培养皿中, 待细胞密度达到80%~90%, 使用电镜专用固定液进行固定, 随后使用刮刀将细胞刮起形成“团块状”重悬至离心管中, 随后进行梯度脱水(置于50%、70%、80%、90%、100%丙酮, 各15 min)、渗透(置于丙酮/包埋剂1:3, 4 °C过夜; 置于纯包埋剂, 4 °C过夜)和包埋(置于纯包埋剂, 37 °C、45 °C、60 °C, 各24 h), 将包埋好的细胞进行醋酸双氧铀和柠檬酸铅染色, 将染色后的切片放置在铜网上, 晾干后进行透射电镜观察。

1.10 MitoSOX线粒体活性氧检测

将骨肉瘤细胞种植于12孔板中, 待细胞密度达到80%~90%, 添加5 mmol/L的MitoSOX Red溶液, 在培养箱中继续孵育30 min后使用PBS洗去残留的MitoSOX Red溶液, 清洗3遍后在荧光显微镜下进行拍照检测。

1.11 TUNEL染色

将骨肉瘤组织冰冻切片使用4%多聚甲醛在室温固定60 min后, 使用PBS清洗2遍每遍10 min, 滴加50 μL TUNEL检测液, 37 °C避光孵育60 min。用抗荧光淬灭封片液封片后荧光显微镜下观察。

1.12 统计学处理

以上各项实验均进行3次重复独立实验, Graphpad Prism 9.0用于统计分析, 用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)来表示计量资料。多组各组间差异比较则采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CNR1在骨肉瘤组织中上调表达

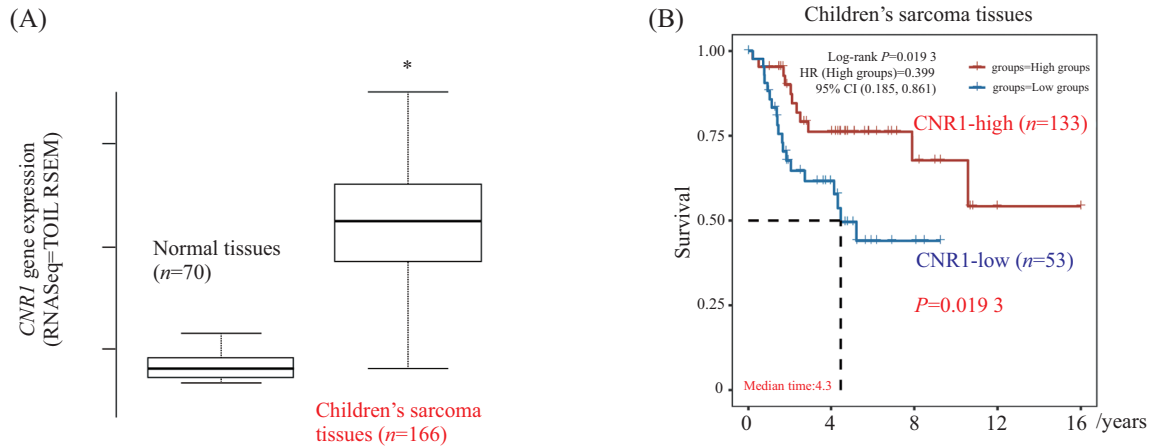
搜索TARGET Pan-Cancer(PANCAN)数据库, 发现在儿童骨肉瘤组织中CNR1表达水平显著高于正常组织($P<0.05$), 差异具有统计学意义(图1A)。通过Kaplan Meier生存分析提示, CNR1高表达组患者的远期生存率高于CNR1低表达组($P=0.019\ 3$), 差异具有统计学意义(图1B), 说明CNR1可能是重要的骨肉瘤抑癌因子。

2.2 CNR1过表达慢病毒成功感染骨肉瘤K7M2细胞系

使用带EGFP绿色荧光标签的CNR1过表达慢病毒感染骨肉瘤K7M2细胞系, 发现空载体对照组(OE-Ctrl)和CNR1过表达组(OE-CNR1)均带上绿色荧光, 提示感染成功(图2A)。免疫印迹检测各组细胞CNR1的表达情况, 发现OE-CNR1组的CNR1表达水平显著高于对照组($P<0.001$)(图2B)。

2.3 CNR1过表达抑制骨肉瘤细胞在体外恶性进展

CCK-8检测各组细胞的活性, 发现OE-CNR1组的增殖能力显著降低(图3A)。划痕实验发现OE-CNR1组的增殖能力和平面迁移能力显著降低(图3B)。克隆形成实验和Transwell细胞侵袭实验发现CNR1过表达抑制了骨肉瘤细胞的集落形成能力和侵袭能力(图3C和图3D)。流式细胞实验发现CNR1过表达促进了骨肉瘤细胞的凋亡(图3E)。免疫印迹结果提示高表达的CNR1下调了Bcl2和Bcl-x1的表达, 并且上调了Bax和Cleaved Caspase-9的表达(图3F和图3G)。以上的结果证实了CNR1过表达抑制骨肉瘤细胞在体外的恶性进展。

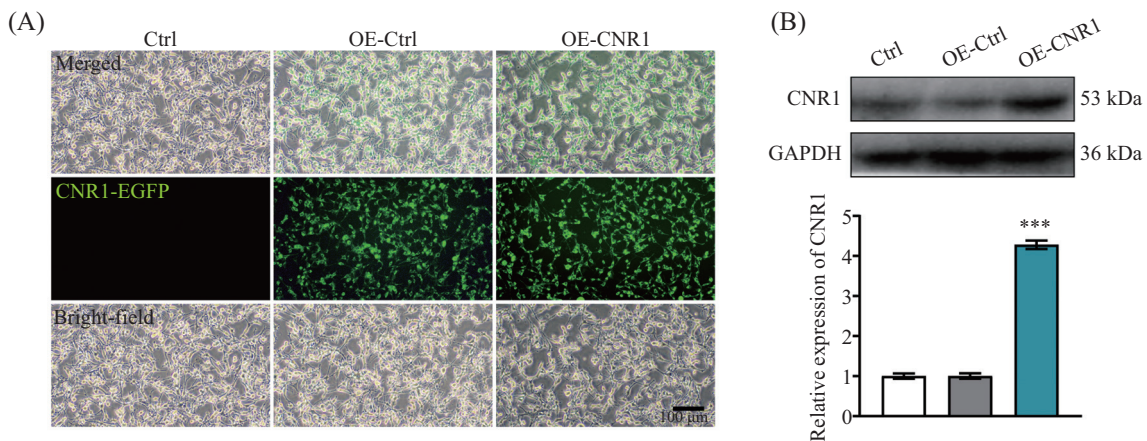


A: TARGET Pan-Cancer(PANCAN)数据库中CNR1在儿童骨肉瘤组织中上调表达, $*P<0.05$, 与正常组织组比较。B: Kaplan Meier生存分析提示CNRI高表达患者的远期生存率更高。

A: CNR1 is up-regulated in pediatric osteosarcoma tissues in the TARGET Pan-Cancer (PANCAN) database, $*P<0.05$ compared with normal tissues group. B: Kaplan Meier survival analysis suggests that patients with high expression of CNR1 have a higher long-term survival rate.

图1 CNR1在儿童骨肉瘤组织中上调表达

Fig.1 CNR1 is up-regulated in pediatric osteosarcoma tissues



A: 荧光显微镜明场和荧光拍照。B: 免疫印迹检测各组细胞CNR1的表达, $n=3$ 。*** $P<0.001$, 与OE-Ctrl比较。Ctrl: 空白对照组; OE-Ctrl: 空载体对照慢病毒组; OE-CNR1: CNR1过表达慢病毒组。

A: fluorescence microscopy bright-field and fluorescence photographs were taken. B: immunoblotting to detect CNR1 expression in each group of cells. $n=3$. *** $P<0.001$ compared with OE-Ctrl group. Ctrl: control group; OE-Ctrl: empty vector lentivirus group; OE-CNR1: CNR1 overexpression lentivirus group.

图2 构建CNR1过表达的K7M2骨肉瘤细胞系

Fig.2 Construction of CNR1 overexpressing K7M2 osteosarcoma cell line

2.4 CNR1过表达激活FIS1促进骨肉瘤细胞线粒体裂解

通过透射电镜, 我们检测CNRI引起的亚细胞结构变化。我们发现OE-CNR1组的过度裂解的线粒体呈现碎小的“圆球状”, 而Ctrl组和OE-Ctrl组的线粒体呈现“短棒状”(图4A)。使用线粒体活性氧探针MitoSOX检测线粒体的氧化应激水平, 发现CNRI过表达显著促进了骨肉瘤细胞线粒体的ROS聚集(图4B)。线粒体的形态变化主要由FIS1、DRP1、

MFN1和MFN2蛋白进行调控, 免疫印迹实验发现CNRI过表达显著激活了FIS1, 从而引起了线粒体的过度裂解(图4C和图4D)。

2.5 在载瘤裸鼠体内, CNR1过表达抑制骨肉瘤细胞生长

将OE-CNR1和OE-Ctrl组的K7M2骨肉瘤细胞种植于裸鼠胫骨内3周后取材, 发现CNRI过表达显著抑制骨肉瘤细胞在裸鼠体内的增殖(图5A~图5C)。免疫印迹实验检测线粒体形态调控相关蛋白的表

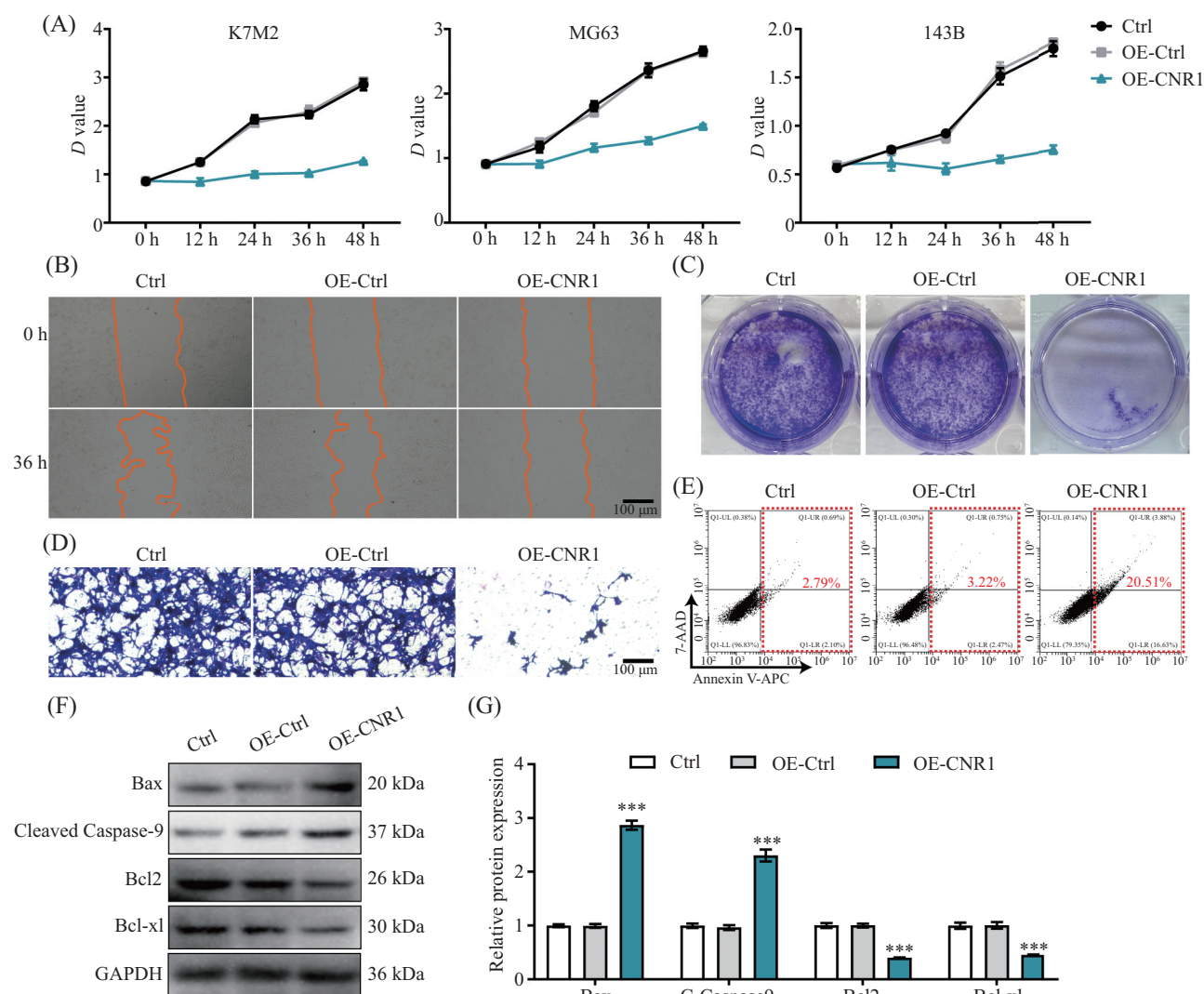


图3 CNR1过表达抑制骨肉瘤细胞在体外恶性进展

Fig.3 CNR1 overexpression inhibits malignant progression of osteosarcoma cells *in vitro*

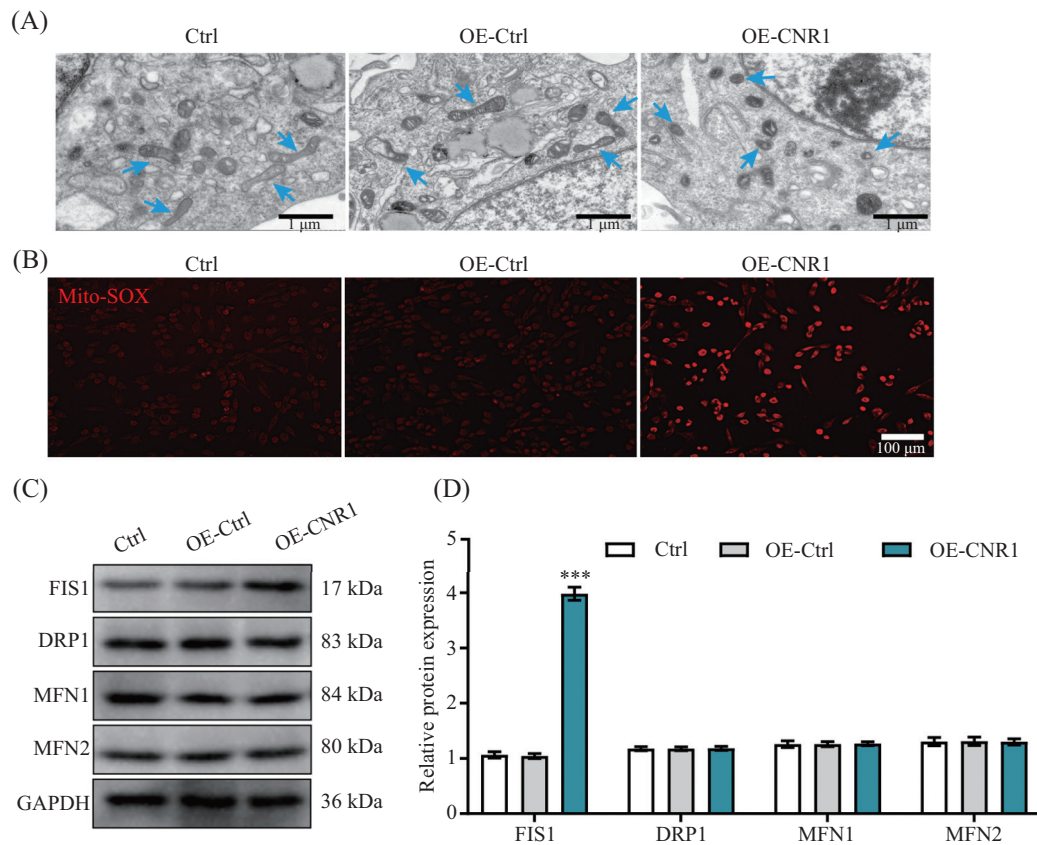
达水平,发现CNR1过表达显著促进了FIS1高表达(图5D和图5E)。对冰冻切片进行TUNEL染色,发现CNR1过表达显著促进骨肉瘤细胞凋亡(图5F)。以上结果证实了在载瘤裸鼠体内,CNR1过表达促进骨肉瘤细胞线粒体凋亡,抑制骨肉瘤细胞生长。

3 讨论

内源性大麻素系统是维持机体内环境稳定的

重要生理系统之一,也是脂质代谢平衡关键调控系统^[13]。内源性大麻素系统主要由内源性大麻素及其衍生物,大麻素受体CNR1、CNR2,非经典大麻素受体以及各种代谢酶组成,并且广泛分布在全身各种组织^[14]。近年来,除了神经系统相关疾病外,内源性大麻素系统在肿瘤疾病(例如胃癌、肠癌、乳腺癌)中的作用机制也获得了密切的关注^[15]。

CNR1是内源性大麻素系统中最重要经典受



A: 透射电镜检测线粒体形态。B: 荧光显微镜拍摄线粒体活性氧探针MitoSOX。C、D: 免疫印迹检测各组细胞线粒体动力学相关蛋白的表达, $n=3$ 。*** $P < 0.001$, 与OE-Ctrl组比较。Ctrl: 空白对照组; OE-Ctrl: 空载体对照慢病毒组; OE-CNR1: CNR1过表达慢病毒组。

A: transmission electron microscopy to detect mitochondrial morphology. B: fluorescence microscopy to photograph mitochondrial reactive oxygen probe MitoSOX. C,D: immunoblotting to detect the expression of proteins related to mitochondrial dynamics in each group of cells. $n=3$. *** $P < 0.001$ compared with OE-Ctrl group. Ctrl: control group; OE-Ctrl: empty vector lentivirus group; OE-CNR1: CNR1 overexpression lentivirus group.

图4 CNR1过表达激活FIS1促进K7M2骨肉瘤细胞线粒体裂解

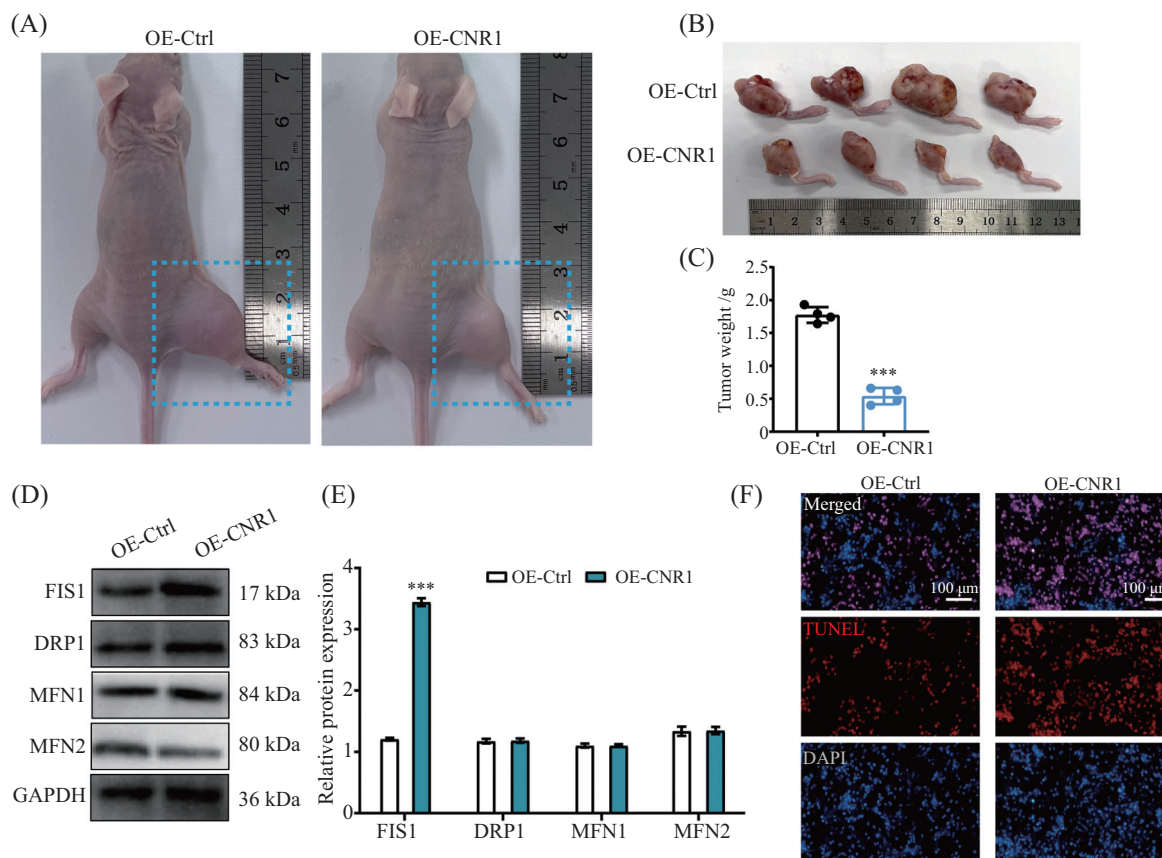
Fig.4 CNR1 overexpression activates FIS1 to promote mitochondrial cleavage in osteosarcoma cells

体之一, 是一种G蛋白偶联膜受体, 参与细胞内的关键信号转导, 介导内源性大麻素系统参与多种细胞生物效应^[16]。CNR1参与调控腺苷酸环化酶系统中第二信使cAMP的活性, 调节细胞免疫功能、基因表达、膜蛋白降解等从而调控多种细胞生理功能和物质代谢^[17]。CNR1还可通过细胞内钙调素系统影响细胞内和细胞外钙水平, 降低肿瘤细胞间的相互黏附程度, 增强细胞对细胞外基质的活动性和细胞降解能力, 促进细胞迁移^[18]。此外, CNR1还与细胞自噬和内质网应激密切相关, 在细胞程序性死亡中发挥重要作用^[19]。

线粒体是骨肉瘤细胞的“能量供应站”, 其形态的融合与分裂呈动态平衡状态, 以保证线粒体间的物质交换、损伤线粒体的修复与清除及维持线粒体形态^[20]。若融合与分裂平衡失调则可能出现线粒体功能异常, 其中融合缺陷将使内源性及解耦联的呼吸

频率降低, 使细胞生长受到抑制; 而分裂缺陷时则呼吸链复合IV活性受抑、氧化磷酸化障碍和ATP合成减少。线粒体的形态主要由FIS1/DRP1/MFN1/MFN2等蛋白调控^[21]。通过融合和分裂, 线粒体可以在数秒内改变大小、形态以及位置。线粒体的融合可以通过将损伤的线粒体的内容物混合以缓解应激的压力^[22]。而线粒体的分裂不仅可以生成新的线粒体, 同时还可以通过清除损伤和功能异常的线粒体以保证其正常的生理功能^[23]。当遭受外界条件干预或微环境稳态被破坏时, 线粒体形态可呈现过度融合或过度分裂的状态, 进而代谢功能失调。

肿瘤细胞具有旺盛的代谢能力, 正常的线粒体功能及充足的能量是维持肿瘤细胞生理机能的必备条件。因此, 在肿瘤治疗方面, 既往诸多的研究强调靶向线粒体、阻断肿瘤细胞能量供应的重要性。PENG等^[24]研究报道新型抗癌药物Bavachin引起线



A~C: 载瘤裸鼠取材拍照和统计分析, $n=4$ 。D、E: 免疫印迹检测裸鼠骨肉瘤组织中线粒体动力学相关蛋白的表达, $n=3$ 。F: TUNEL染色检测骨肉瘤组织切片的凋亡水平。*** $P<0.001$, 与OE-Ctrl组比较。OE-Ctrl: 空载体对照慢病毒组; OE-CNR1: CNR1过表达慢病毒组。

A~C: tumor-carrying nude mice were sampled for photographs and statistical analyses. $n=4$. D,E: expression of proteins related to mitochondrial dynamics was detected by immunoblotting in osteosarcoma tissues of nude mice. $n=3$. F: apoptosis levels of osteosarcoma tissue sections were detected by TUNEL staining. *** $P<0.001$ compared with OE-Ctrl group. OE-Ctrl: empty vector lentivirus group; OE-CNR1: CNR1 overexpression lentivirus group.

图5 在载瘤裸鼠体内, CNR1过表达抑制骨肉瘤细胞生长

Fig.5 CNR1 overexpression promotes mitochondrial apoptosis in osteosarcoma cells in tumor-carrying nude mice

粒体过度裂解、线粒体膜密度升高和线粒体嵴减少, 诱导骨肉瘤细胞铁死亡。YI等^[25]设计了线粒体靶向的纳米颗粒药物, 当药物在线粒体中聚集之后促进了线粒体与溶酶体的融合, 激活了骨肉瘤细胞自噬和线粒体途径凋亡。

综上所述, 本实验发现 CNR1 高表达激活了 FIS1 引起线粒体过度裂解, 从而诱发了骨肉瘤细胞凋亡、抑制了骨肉瘤在体内和体外恶性进展, 提示 CNR1 可能是重要的骨肉瘤抑癌因子和治疗靶点。但“CNR1 在临床骨肉瘤样本中的表达与患者远期生存率的关系以及骨肉瘤细胞转导 CNR1 信号通路的第二信使”——这些科学问题仍需进一步实验探究。

参考文献 (References)

[1] YU S, YAO X. Advances on immunotherapy for osteosarcoma [J].

Mol Cancer, 2024, 23(1): 192.

- [2] BIELACK S S, KEMPF-BIELACK B, DELLING G, et al. Prognostic factors in high-grade osteosarcoma of the extremities or trunk: an analysis of 1,702 patients treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma study group protocols [J]. J Clin Oncol, 2023, 41(27): 4323-37.
- [3] MAKI R G, SCHWARTZ G K. Flashback foreword: prognostic factors in osteosarcoma [J]. J Clin Oncol, 2023, 41(27): 4321-2.
- [4] LIAO D, ZHONG L, YIN J, et al. Chromosomal translocation-derived aberrant Rab22a drives metastasis of osteosarcoma [J]. Nat Cell Biol, 2020, 22(7): 868-81.
- [5] XIE L, XU J, SUN X, et al. Apatinib plus camrelizumab (anti-PD1 therapy, SHR-1210) for advanced osteosarcoma (APFAO) progressing after chemotherapy: a single-arm, open-label, phase 2 trial [J]. J Immunother Cancer, 2020, 8(1): e000798.
- [6] BAGLIO S R, LAGERWEIJ T, PÉREZ-LANZÓN M, et al. Blocking tumor-educated MSC paracrine activity halts osteosarcoma progression [J]. Clin Cancer Res, 2017, 23(14): 3721-33.
- [7] MATSUOKA K, BAKIRI L, WOLFF L I, et al. Wnt signaling and Lox12 promote aggressive osteosarcoma [J]. Cell Res, 2020,

- 30(10): 885-901.
- [8] 赵倩, 杨广, 曹莉华, 等. CNR1基因遗传变异对利拉鲁肽治疗早期2型糖尿病患者临床疗效的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学(ZHAO Q, YANG G, CAO L H, et al. Effect of genetic variation of CNR1 gene on clinical efficacy of liraglutide in early type 2 diabetes [J]. Chin J Clin Pharmacol Ther), 2020, 25(2): 182-8.
- [9] 丁生权, 王志军, 倪新莉. 大麻素受体启动子真核报告质粒的构建及活性分析[J]. 神经解剖学杂志(DING S Q, WANG Z J, NI X L. Construction and analysis of luciferase receptor vectors of human CNR1 promoter [J]. Chin J Neuro), 2011, 27(1): 50-4.
- [10] KALKAN H, PANZA E, PAGANO E, et al. Dysfunctional endocannabinoid CB1 receptor expression and signaling contribute to skeletal muscle cell toxicity induced by simvastatin [J]. Cell Death Dis, 2023, 14(8): 544.
- [11] IANNOTTI F A, PAGANO E, GUARDIOLA O, et al. Genetic and pharmacological regulation of the endocannabinoid CB1 receptor in Duchenne muscular dystrophy [J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 3950.
- [12] PACHER P, STEFFENS S, HASKÓ G, et al. Cardiovascular effects of marijuana and synthetic cannabinoids: the good, the bad, and the ugly [J]. Nat Rev Cardiol, 2018, 15(3): 151-66.
- [13] SORIA-GÓMEZ E, BELLOCCHIO L, REGUERO L, et al. The endocannabinoid system controls food intake via olfactory processes [J]. Nat Neurosci, 2014, 17(3): 407-15.
- [14] ARNOLD W R, CARNEVALE L N, XIE Z, et al. Anti-inflammatory dopamine- and serotonin-based endocannabinoid epoxides reciprocally regulate cannabinoid receptors and the TRPV1 channel [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 926.
- [15] HONAR Y S, JAVAHER S, SOLEIMANI M, et al. Advanced stage, high-grade primary tumor ovarian cancer: a multi-omics dissection and biomarker prediction process [J]. Sci Rep, 2023, 13(1): 17265.
- [16] MILEWICZ A, TWOROWSKA-BARDZIŃSKA U, JEŃDRZEJUK D, et al. Are endocannabinoid type 1 receptor gene (CNR1) polymorphisms associated with obesity and metabolic syndrome in postmenopausal Polish women [J]. Int J Obes, 2011, 35(3): 373-7.
- [17] FENG Q, VICKERS K C, ANDERSON M P, et al. A common functional promoter variant links CNR1 gene expression to HDL cholesterol level [J]. Nat Commun, 2013, 4(1): 1973.
- [18] HUYNH K. CNR1 antagonism attenuates cannabis-induced atherosclerosis [J]. Nat Rev Cardiol, 2022, 19(7): 432.
- [19] HASEGAWA Y, KIM J, URSINI G, et al. Microglial cannabinoid receptor type 1 mediates social memory deficits in mice produced by adolescent THC exposure and 16p11.2 duplication [J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 6559.
- [20] KUMMER E, BAN N. Mechanisms and regulation of protein synthesis in mitochondria [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2021, 22(5): 307-25.
- [21] WANG H, VANT J W, ZHANG A, et al. Organization of a functional glycolytic metabolon on mitochondria for metabolic efficiency [J]. Nat Metab, 2024, 6(9): 1712-35.
- [22] XIONG X, HOU J, ZHENG Y, et al. NAD⁺-boosting agent nicotinamide mononucleotide potently improves mitochondria stress response in Alzheimer's disease via ATF4-dependent mitochondrial UPR [J]. Cell Death Dis, 2024, 15(10): 744.
- [23] SJÖSTRAND F S. Electron microscopy of mitochondria and cytoplasmic double membranes: ultra-structure of rod-shaped mitochondria [J]. Nature, 1953, 171(4340): 30-1.
- [24] PENG F, CAI W, LI J, et al. CIC-5 Downregulation induces osteosarcoma cell apoptosis by promoting Bax and tBid complex formation [J]. Front Oncol, 2020, 10: 556908.
- [25] YI X, CAO Z, YUAN Y, et al. Design and synthesis of a novel mitochondria-targeted osteosarcoma theranostic agent based on a PIM1 kinase inhibitor [J]. J Control Release, 2021, 332: 434-47.