

CXCL12/CXCR4 可调节氧糖剥夺 / 复氧诱导的 SH-SY5Y 神经元细胞自噬

孟海宁 贾超 李庆淑 谢伟峰 王素梅 曲彦

康复大学青岛医院(青岛市市立医院)重症医学科, 青岛 266071

通信作者: 曲彦, Email: qdquyan@aliyun.com

【摘要】 目的 探讨趋化因子 C-X-C 基序配体 12/C-X-C 趋化因子受体 4(CXCL12/CXCR4)信号轴对体外氧糖剥夺 / 复氧(OGD/R)模型神经元细胞 SH-SY5Y 凋亡和自噬的影响及其作用机制。**方法** 将 SH-SY5Y 细胞分为 OGD/R 组和非 OGD/R 组,其中 OGD/R 组制备 OGD/R 模型;非 OGD/R 组不进行任何处理。将 SH-SY5Y 细胞分为 CXCL12⁺ 组和 CXCL12⁻ 组,其中 CXCL12⁺ 组在 OGD/R 模型复氧时加入 0.1 mg/L 外源性重组 CXCL12(rhCXCL12);CXCL12⁻ 组不加入 rhCXCL12。将 SH-SY5Y 细胞分为 CXCL12+AMD3100 组和 CXCL12 组,其中 CXCL12+AMD3100 组在 OGD/R 前加入 2.5 mg/L CXCR4 抑制剂普乐沙福(AMD3100)预处理 2 h,复氧时加入 2.5 mg/L AMD3100 和 0.1 mg/L CXCL12;CXCL12 组不加入 AMD3100。将 SH-SY5Y 细胞分为 CXCR4 小干扰 RNA(siCXCR4)组和阴性对照小干扰 RNA(siNC)组,其中 siCXCR4 组干扰 CXCR4 表达后构建 OGD/R 模型,在复氧时加入 0.1 mg/L rhCXCL12;siNC 组不干扰 CXCR4 的表达,其余操作同上。采用蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测各组细胞自噬相关蛋白 16(ATG16)、微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3)、水通道蛋白 3(AQP3)、CXCR4 的蛋白表达;采用流式细胞仪检测各组细胞的细胞凋亡情况和 CXCR4 表达。**结果** 与非 OGD/R 组比较,OGD/R 组细胞凋亡明显增多,ATG16、LC3、AQP3 和 CXCR4 的蛋白表达水平均明显降低(均 $P<0.05$),CXCR4 的荧光表达也明显减弱,提示 OGD/R 可同时影响神经元细胞的凋亡和自噬,抑制 SH-SY5Y 细胞 CXCR4 和 AQP3 的表达。与 CXCL12⁻ 组比较,CXCL12⁺ 组细胞凋亡无明显变化,但 ATG16、LC3 和 AQP3 的蛋白表达水平明显升高(ATG16/GAPDH: 1.21 ± 0.10 比 1.00 ± 0.00 , LC3/ β -actin: 1.22 ± 0.10 比 1.00 ± 0.00 , AQP3/ β -actin: 1.26 ± 0.04 比 1.00 ± 0.00 , 均 $P<0.05$),CXCR4 的荧光表达也明显增强(荧光强度: 1.19 ± 0.05 比 1.00 ± 0.00 , $P<0.05$),提示 CXCL12 可能通过 CXCR4/AQP3 促进 OGD/R SH-SY5Y 细胞的自噬。与 CXCL12 组比较,CXCL12+AMD3100 组细胞凋亡无明显变化,但 ATG16 和 LC3 的蛋白表达水平明显降低(ATG16/GAPDH: 0.75 ± 0.08 比 1.00 ± 0.00 , LC3/GAPDH: 0.86 ± 0.07 比 1.00 ± 0.00 , 均 $P<0.05$),提示 CXCL12 可以通过 CXCR4 诱导 OGD/R SH-SY5Y 细胞的自噬。与 siNC 组比较,siCXCR4 组细胞凋亡无明显变化,ATG16、LC3、AQP3 和 CXCR4 的蛋白表达水平明显降低(ATG16/GAPDH: 0.76 ± 0.06 比 1.00 ± 0.00 , LC3/GAPDH: 0.79 ± 0.11 比 1.00 ± 0.00 , AQP3/GAPDH: 0.81 ± 0.05 比 1.00 ± 0.00 , CXCR4/GAPDH: 0.86 ± 0.04 比 1.00 ± 0.00 , 均 $P<0.05$),提示干扰 CXCR4 可以通过 AQP3 抑制 OGD/R SH-SY5Y 细胞的自噬。**结论** CXCL12/CXCR4 信号轴可以通过 AQP3 调节 OGD/R 诱导的 SH-SY5Y 细胞自噬,但不影响凋亡,表明 CXCL12/CXCR4 信号轴在脑缺血 / 再灌注损伤神经元自噬中发挥作用。

【关键词】 趋化因子 C-X-C 基序配体 12; C-X-C 趋化因子受体 4; 脑缺血 / 再灌注损伤; 自噬; 水通道蛋白 3

基金项目: 国家自然科学基金(81971873)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20241215-01029

C-X-C motif chemokine ligand 12/C-X-C motif chemokine receptor 4 regulates oxygen glucose deprivation/reoxygenation-induced autophagy in SH-SY5Y neuronal cells

Meng Haining, Jia Chao, Li Qingshu, Xie Weifeng, Wang Sumei, Qu Yan

Department of Intensive Care Unit, Qingdao Hospital, University of Health and Rehabilitation Sciences (Qingdao Municipal Hospital), Qingdao 266071, China

Corresponding author: Qu Yan, Email: qdquyan@aliyun.com

【Abstract】 Objective To explore the effects and mechanisms of the C-X-C motif chemokine ligand 12/C-X-C motif chemokine receptor 4 (CXCL12/CXCR4) signaling axis on apoptosis and autophagy in SH-SY5Y neuronal cells subjected to oxygen-glucose deprivation/reperfusion (OGD/R) model *in vitro*. **Methods** SH-SY5Y cells were divided into the following groups: OGD/R group and non-OGD/R group, with the OGD/R group subjected to OGD/R modeling and the non-OGD/R group receiving no treatment. Cells were also divided into CXCL12⁺ and CXCL12⁻ groups; the CXCL12⁺ group received 0.1 mg/L exogenous recombinant CXCL12 (rhCXCL12) at reoxygenation, while the CXCL12⁻ group did not. Another set of cells was divided into CXCL12+AMD3100 and CXCL12 groups; the CXCL12+AMD3100 group was pretreated with 2.5 mg/L AMD3100, a CXCR4 inhibitor, for 2 hours before OGD/R

and received both 2.5 mg/L AMD3100 and 0.1 mg/L rhCXCL12 at reoxygenation, whereas the CXCL12 group received rhCXCL12 only. Additionally, cells were divided into small interfering RNA CXCR4 (siCXCR4) and small interfering RNA negative control (siNC) groups; the siCXCR4 group underwent CXCR4 knockdown before OGD/R modeling and received 0.1 mg/L rhCXCL12 at reoxygenation, while the siNC group, transfected with a negative control, received the same treatment. Protein expression of autophagy-related 16 (ATG16), microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3), aquaporin-3 (AQP3), and CXCR4 was detected by Western blotting. Apoptosis rate and CXCR4 expression were measured by flow cytometry. **Results** Compared with the non-OGD/R group, the OGD/R group showed a significantly increased apoptosis rate and markedly decreased protein expression levels of ATG16, LC3, AQP3, and CXCR4 (all $P < 0.05$). CXCR4 fluorescent expression was also significantly reduced, suggesting that OGD/R simultaneously affects neuronal apoptosis and autophagy while inhibiting CXCR4 and AQP3 expression in SH-SY5Y cells. Compared with the CXCL12⁻ group, the CXCL12⁺ group exhibited no significant change in apoptosis rate but demonstrated significantly increased protein expression of ATG16, LC3, and AQP3 (ATG16/GAPDH: 1.21 ± 0.10 vs. 1.00 ± 0.00 ; LC3/ β -actin: 1.22 ± 0.10 vs. 1.00 ± 0.00 ; AQP3/ β -actin: 1.26 ± 0.04 vs. 1.00 ± 0.00 ; all $P < 0.05$). CXCR4 expression was also significantly enhanced (fluorescence intensity: 1.19 ± 0.05 vs. 1.00 ± 0.00 , $P < 0.05$), indicating that CXCL12 may promote autophagy in OGD/R-injured SH-SY5Y cells via the CXCR4/AQP3 pathway. Compared with the CXCL12 group, the CXCL12+AMD3100 group showed no significant difference in apoptosis rate but significantly lower protein levels of ATG16 and LC3 (ATG16/GAPDH: 0.75 ± 0.08 vs. 1.00 ± 0.00 ; LC3/GAPDH: 0.86 ± 0.07 vs. 1.00 ± 0.00 ; both $P < 0.05$), suggesting that CXCL12 induces autophagy in OGD/R SH-SY5Y cells through CXCR4. Compared with the siNC group, the siCXCR4 group showed no significant change in apoptosis rate but significantly reduced protein expression of ATG16, LC3, AQP3, and CXCR4 (ATG16/GAPDH: 0.76 ± 0.06 vs. 1.00 ± 0.00 ; LC3/GAPDH: 0.79 ± 0.11 vs. 1.00 ± 0.00 ; AQP3/GAPDH: 0.81 ± 0.05 vs. 1.00 ± 0.00 ; CXCR4/GAPDH: 0.86 ± 0.04 vs. 1.00 ± 0.00 ; all $P < 0.05$), indicating that CXCR4 knockdown suppresses OGD/R-induced autophagy in SH-SY5Y cells likely via AQP3. **Conclusion** The CXCL12/CXCR4 signaling axis can regulate OGD/R-induced autophagy in SH-SY5Y cells through AQP3 without affecting apoptosis, indicating a role for this pathway in neuronal autophagy during cerebral ischemia/reperfusion injury.

[Key words] C-X-C motif chemokine ligand 12; C-X-C motif chemokine receptor 4; Cerebral ischemia/reperfusion injury; Autophagy; Aquaporin 3

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81971873)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20241215-01029

CXC 家族在炎症反应等病理过程中发挥细胞的黏附、激活和迁移作用,在功能上可分为稳态趋化因子和炎症趋化因子。趋化因子 C-X-C 基序配体 12 (C-X-C motif chemokine ligand 12, CXCL12) 属于小分子量稳态趋化因子,广泛表达于脑部等多个组织,并且在神经系统的所有细胞中都有表达。重要的是, CXCL12 可以影响神经系统中神经元的迁移和轴突寻路^[1-4]。这证明 CXCL12 在神经元的存活中扮演着重要的角色。

缺血性脑卒中相关研究显示, CXCL12 与 C-X-C 趋化因子受体 4 (C-X-C motif chemokine receptor 4, CXCR4) 呈差异表达,且主要表达在星形胶质细胞和神经元中^[3]。目前研究已经证明血清中 CXCL12 的表达水平与脑卒中患者的不良结局密切相关,血清 CXCL12 水平可以反映脑卒中的严重程度,是急性脑卒中患者重要的预后预测指标^[5-6]。抑制 CXCL12 的表达不仅可以抑制缺血性脑卒中的炎症反应,还可以促进血管生成^[7]。此外, CXCL12 与其受体 CXCR4 结合后发挥细胞趋化、诱导信号转导、调节细胞存活的作用^[8]。在脑卒中后期,使用 CXCR4 抑制剂 CX549 可以抑制炎症因子的表达,减

少脑梗死体积,改善行为学功能,增加损伤神经元的存活,对脑卒中的神经损伤起到保护作用^[9]。然而,在脑卒中小鼠模型中,使用 CXCL12 受体 CXCR4 的另一种抑制剂普乐沙福 (plerixafor, AMD3100) 处理 14 d,可阻断重复缺氧预处理产生的抗炎表型及对病变体积的保护作用^[10]。这些研究表明 CXCL12/CXCR4 在缺血性脑卒中中扮演着重要角色,但是具体的作用机制尚不清楚,需要进一步研究。

有研究显示,神经元暴露于氧糖剥夺/复氧 (oxygen-glucose deprivation/reperfusion, OGD/R) 模型中,可以引起神经元的损伤和诱导自噬^[11-13]。促进细胞的自噬可以降低细胞的凋亡,促进细胞存活,发挥神经保护作用^[14-15]。然而,促炎细胞因子白细胞介素-17A (interleukin-17A, IL-17A) 介导的自噬又可以促进缺血性脑卒中导致的神经损伤^[16]。可见自噬在脑缺血/再灌注的神经损伤中发挥重要作用,但对神经元的存活作用存在争议,作用机制也缺乏足够的研究。CXCL12/CXCR4 信号轴与自噬的关系最早是在套细胞淋巴瘤 (mantle cell lymphoma, MCL) 中发现的^[17],之后关于 CXCL12/CXCR4 影响自噬的研究陆续被报道。CXCL12 可以通过促进自

噬影响牙髓干细胞(dental pulp stem cell, DPSC)的神经分化^[18],不仅如此,CXCL12 还可以通过抑制磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)、蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt)和哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)的磷酸化促进面神经损伤中施万细胞的自噬,但不影响凋亡^[19]。但是激活 CXCL12/CXCR4 可以促进急性髓系白血病(acute myelogenous leukemia, AML)细胞的自噬,降低阿糖胞苷导致的 AML 细胞凋亡^[20]。说明 CXCL12/CXCR4 对细胞凋亡的影响目前尚不统一,对自噬的影响也相对较少。并且目前尚无 CXCL12/CXCR4 信号轴对脑缺血/再灌注神经损伤自噬的研究,所以值得进一步探究。

值得注意的是,缺氧/再复氧可以引起神经细胞中水通道蛋白(aquaporins, AQP)家族蛋白的差异表达^[21]。AQP3 作为 AQP 家族的一员,干扰 AQP3 的表达后可以抑制自噬的诱导^[22],在体内和体外过表达 AQP3 可以诱导自噬^[23]。值得关注的是, CXCL12 可以促进 AQP3 的易位,进而调节 AQP3 转运过氧化氢(hydrogen peroxide, H₂O₂)的功能^[24]。由此推测, AQP3 可能与缺血性脑卒中神经自噬的发生密切相关,然而是否受 CXCL12/CXCR4 的调节尚不清楚。因此,本研究通过利用外源性重组 CXCL12、CXCR4 抑制剂 AMD3100 以及干扰 CXCR4 来探究 CXCL12/CXCR4 是否通过调节 AQP3 影响脑缺血/再灌注损伤神经元的自噬和凋亡。

1 资料与方法

1.1 主要仪器和试剂: 10% 胎牛血清(北京全式金生物公司), 1% 青霉素链霉素(北京索莱宝公司), DMEM(美国 HyClone 公司), 瞬时转染的小干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA; 江苏吉玛公司), 脂质体转染试剂 Lipofectamine 2000(美国 Invitrogen 公司), 无糖培养基(美国 Gibco 公司), CXCR4 及其特异性抑制剂 AMD3100(美国 Santa 公司), CXCL12(美国 Pepro Tech 公司), AQP3(英国 Abcam 公司), 3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、Annexin V-异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)细胞凋亡检测试剂盒(上海碧云天公司), 微管相关蛋白 1 轻链 3(microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3)、自噬相关蛋白 16(autophagy-related protein 16, ATG16; 美国 CST 公司), 抗兔二抗(上海爱必信公司), CXCR4 抗体(美国 Biolegend 公司)。

1.2 细胞培养: 神经细胞 SH-SY5Y 来自青岛大学生理学实验室,培养于含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素链霉素的 DMEM 混合培养液中,然后置于含 5% 二氧化碳(carbon dioxide, CO₂)的 37 °C 培养箱中。

1.3 细胞转染: 将 50 nmol/L 阴性对照小干扰 RNA(small interfering RNA negative control, siNC)和 50 nmol/L CXCR4 小干扰 RNA(small interfering RNA CXCR4, siCXCR4)分别与 Lipofectamine 2000 共转染于含 2 mL 无血清 DMEM 的 6 孔板中。在培养箱中培养 8 h 后,将无血清的 DMEM 换成含 10% 血清的 DMEM,然后继续在 37 °C 培养箱中培养。

1.4 OGD/R 模型制备: 根据文献[25]的方法制备 OGD/R 模型,将细胞用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)洗涤 2 遍,然后加入无血清的无糖培养基,在 37 °C 的缺氧环境中培养 6 h,然后再将细胞置于含 10% 胎牛血清的 DMEM 的常氧环境中培养 24 h。

1.5 细胞分组及处理: ① 将 SH-SY5Y 细胞分为 OGD/R 组和非 OGD/R 组。OGD/R 组制备 OGD/R 模型;非 OGD/R 组不进行任何处理。② 将 SH-SY5Y 细胞分为 CXCL12⁺ 组和 CXCL12⁻ 组。CXCL12⁺ 组在 OGD/R 模型复氧时加入 0.1 mg/L 外源性重组人 CXCL12(recombinant human CXCL12, rhCXCL12); CXCL12⁻ 组不加入 rhCXCL12。③ 将 SH-SY5Y 细胞分为 CXCL12+AMD3100 组和 CXCL12 组。CXCL12+AMD3100 组在 OGD/R 前加入 2.5 mg/L AMD3100 预处理 2 h,在复氧时加入 2.5 mg/L AMD3100 和 0.1 mg/L CXCL12; CXCL12 组不加入 AMD3100。④ 将 SH-SY5Y 细胞分为 siCXCR4 组和 siNC 组。siCXCR4 组干扰 CXCR4 表达后构建 OGD/R 模型,在复氧时加入 0.1 mg/L rhCXCL12; siNC 组不干扰 CXCR4 的表达,其余操作同上。

1.6 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测 ATG16、LC3、AQP3、CXCR4 的蛋白表达:在细胞中加入细胞裂解液提取细胞总蛋白,蛋白样品行 10% 或 15% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE),然后将凝胶上的蛋白转移到聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上,使用 5% 的脱脂奶粉封闭 2 h,孵育目的蛋白 ATG16、LC3、AQP3、CXCR4 和内参 GAPDH、 β -肌动蛋白(β -actin)的一抗,后孵育抗兔二抗,使用超敏显影液浸泡 PVDF 膜后用数字成像系统显影。

1.7 流式细胞仪检测细胞凋亡:用不含乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetra-acetic acid, EDTA)的胰酶消化收集细胞, PBS 洗涤 1 次后加入 FITC 结合液, 然后按照说明书每个样本中加入 FITC 和碘化丙啶(propidium Iodide, PI)染色液, 常温孵育 15 min 后, 使用 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒在流式细胞仪上进行细胞凋亡检测。

1.8 流式细胞仪检测 CXCR4 表达:用不含 EDTA 的胰酶消化收集细胞, PBS 洗涤 1 次后, 加入 5% BSA 及 0.1% 皂苷进行封闭和破膜 15 min, 然后加入 CXCR4 抗体孵育 20 min, PBS 洗涤 2 次, 采用流式细胞仪检测 CXCR4 的表达。

1.9 统计学分析:采用 Image J 和 GraphPad Prism 软件分析实验数据, 每个实验均进行 3 次独立重复。计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用非配对 t 检验。检验水准 α 值取双侧 0.05。

2 结果

2.1 OGD/R 可诱导 SH-SY5Y 细胞凋亡和抑制细胞自噬:与非 OGD/R 组比较, OGD/R 组细胞凋亡明显增多 (1.414 ± 0.113 比 1, $P < 0.05$; 图 1), ATG16 和 LC3 的蛋白表达明显降低 (均 $P < 0.05$; 表 1; 图 2)。提示 OGD/R 可同时影响神经元细胞的凋亡和自噬。

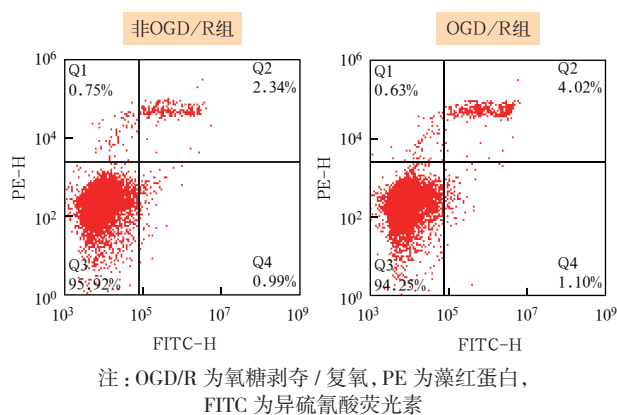


图 1 流式细胞仪检测非 OGD/R 组和 OGD/R 组 SH-SY5Y 细胞的凋亡情况

表 1 非 OGD/R 组与 OGD/R 组 SH-SY5Y 细胞 ATG16、LC3、AQP3 和 CXCR4 的蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	孔数 (孔)	ATG16/ GAPDH	LC3/ GAPDH	AQP3/ GAPDH	CXCR4/ GAPDH
非 OGD/R 组	3	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00
OGD/R 组	3	0.79 $\pm$ 0.04 ^a	0.86 $\pm$ 0.01 ^a	0.81 $\pm$ 0.05 ^a	0.86 $\pm$ 0.04 ^a

注: OGD/R 为氧糖剥夺 / 复氧, ATG16 为自噬相关蛋白 16, LC3 为微管相关蛋白 1 轻链 3, AQP3 为水通道蛋白 3, CXCR4 为 C-X-C 趋化因子受体 4, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶; 与非 OGD/R 组, ^a $P < 0.05$

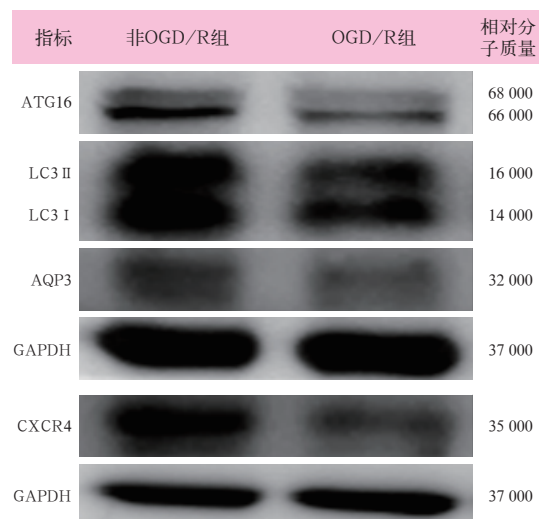


图 2 蛋白质免疫印迹试验 (Western blotting) 检测非 OGD/R 组和 OGD/R 组 SH-SY5Y 细胞 ATG16、LC3、AQP3、CXCR4 蛋白表达

2.2 OGD/R 可抑制 SH-SY5Y 细胞 CXCR4 和 AQP3 的表达:与非 OGD/R 组比较, OGD/R 组 CXCR4 的荧光表达明显减弱 (荧光强度: 0.76 ± 0.11 比 1.00 ± 0.00 , $P < 0.05$; 图 3), AQP3 和 CXCR4 的蛋白表达也明显降低 (均 $P < 0.05$; 表 1; 图 2)。结果表明, OGD/R 可抑制 SH-SY5Y 细胞 AQP3 和 CXCR4 的表达, 提示 AQP3 和 CXCR4 的表达可能对 OGD/R 模型中神经元的损伤起到一定的作用。

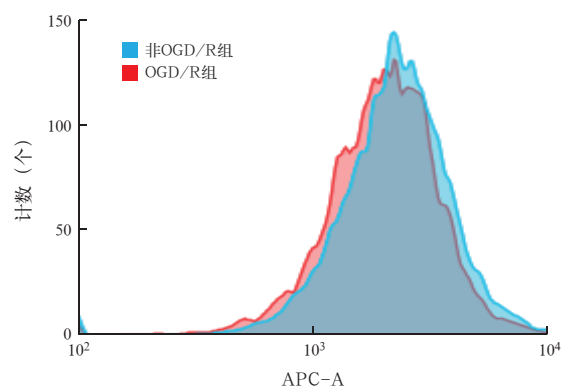
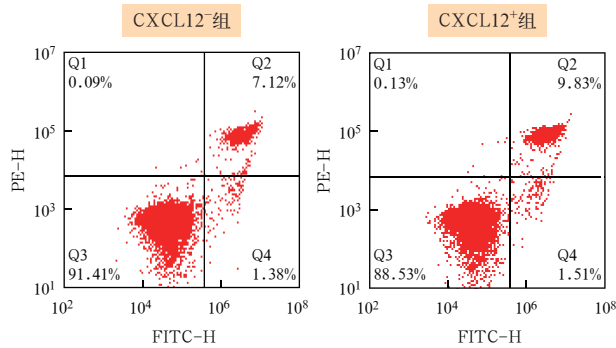


图 3 流式细胞仪检测非 OGD/R 组和 OGD/R 组 SH-SY5Y 细胞 CXCR4 的表达

2.3 CXCL12 可促进 OGD/R SH-SY5Y 细胞的自噬:与 CXCL12⁻组比较, CXCL12⁺组细胞凋亡无明显变化 (1.389 ± 0.464 比 1, $P > 0.05$; 图 4), 但自噬蛋白 LC3 和 ATG16 的蛋白表达明显升高 (均 $P < 0.05$; 表 2; 图 5)。提示 CXCL12 可促进 OGD/R SH-SY5Y 细胞的自噬。



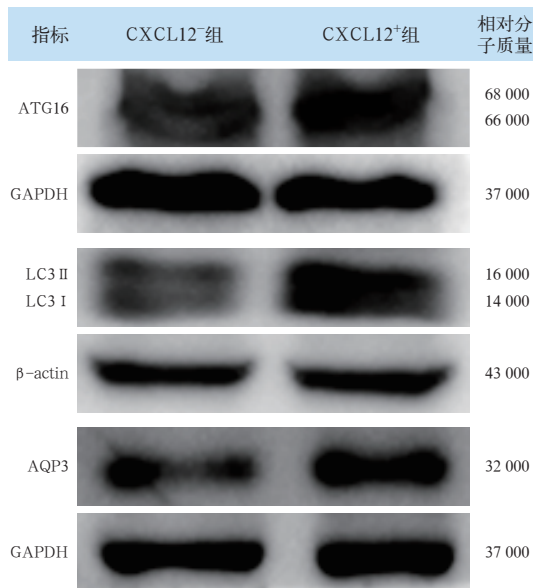
注: CXCL12 为趋化因子 C-X-C 基序配体 12, OGD/R 为氧糖剥夺/复氧, PE 为藻红蛋白, FITC 为异硫氰酸荧光素

图 4 流式细胞仪检测 CXCL12⁻ 组和 CXCL12⁺ 组 OGD/R SH-SY5Y 细胞的凋亡情况

表 2 CXCL12⁻ 组与 CXCL12⁺ 组 OGD/R SH-SY5Y 细胞 ATG16、LC3 和 AQP3 的蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	孔数 (孔)	ATG16/ GAPDH	LC3/ β -actin	AQP3/ β -actin
CXCL12 ⁻ 组	3	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
CXCL12 ⁺ 组	3	1.21 ± 0.10 ^a	1.22 ± 0.10 ^a	1.26 ± 0.04 ^a

注: CXCL12 为趋化因子 C-X-C 基序配体 12, OGD/R 为氧糖剥夺/复氧, ATG16 为自噬相关蛋白 16, LC3 为微管相关蛋白 1 轻链 3, AQP3 为水通道蛋白 3, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶, β -actin 为 β -肌动蛋白; 与 CXCL12⁻ 组比较, ^a $P < 0.05$

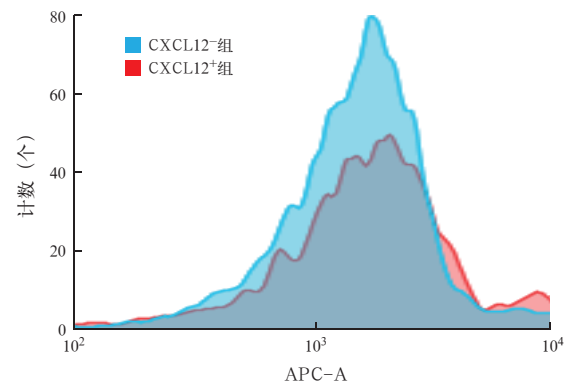


注: CXCL12 为趋化因子 C-X-C 基序配体 12, OGD/R 为氧糖剥夺/复氧, ATG16 为自噬相关蛋白 16, LC3 为微管相关蛋白 1 轻链 3, AQP3 为水通道蛋白 3, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶, β -actin 为 β -肌动蛋白

图 5 蛋白质免疫印迹试验 (Western blotting) 检测 CXCL12⁻ 组和 CXCL12⁺ 组 OGD/R SH-SY5Y 细胞 ATG16、LC3 和 AQP3 蛋白表达

2.4 CXCL12 可促进 OGD/R SH-SY5Y 细胞 CXCR4 和 AQP3 的表达: 与 CXCL12⁻ 组比较, CXCL12⁺ 组 CXCR4 的荧光表达明显增强 (荧光强度: 1.19 ± 0.05

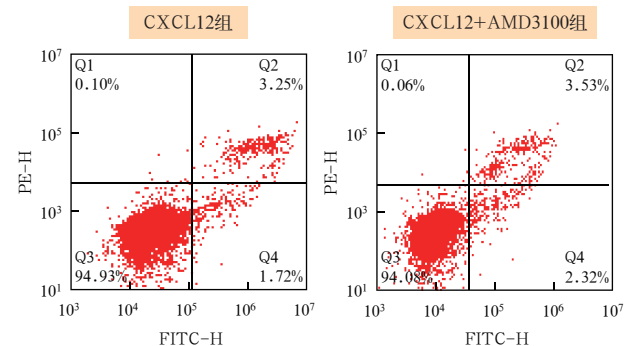
比 1.00 ± 0.00 , $P < 0.05$; 图 6), AQP3 蛋白表达明显升高 ($P < 0.05$; 表 2; 图 5)。提示 CXCL12 可能通过 CXCR4/AQP3 影响 OGD/R SH-SY5Y 细胞的自噬。



注: CXCL12 为趋化因子 C-X-C 基序配体 12, OGD/R 为氧糖剥夺/复氧, CXCR4 为 C-X-C 趋化因子受体 4, APC 为别藻蓝蛋白

图 6 流式细胞仪检测 CXCL12⁻ 组和 CXCL12⁺ 组 OGD/R SH-SY5Y 细胞 CXCR4 的表达

2.5 CXCL12 通过 CXCR4 促进 OGD/R SH-SY5Y 神经细胞的自噬: 与 CXCL12 组比较, CXCL12+AMD3100 组细胞凋亡无明显变化 (1.114 ± 0.163 比 1, $P > 0.05$; 图 7), 但自噬蛋白 ATG16 和 LC3 的蛋白表达明显降低 (均 $P < 0.05$; 表 3; 图 8)。提示 CXCL12 可通过 CXCR4 诱导 OGD/R SH-SY5Y 细胞的自噬。



注: CXCL12 为趋化因子 C-X-C 基序配体 12, AMD3100 为 C-X-C 趋化因子受体 4 抑制剂普乐沙福, OGD/R 为氧糖剥夺/复氧, PE 为藻红蛋白, FITC 为异硫氰酸荧光素

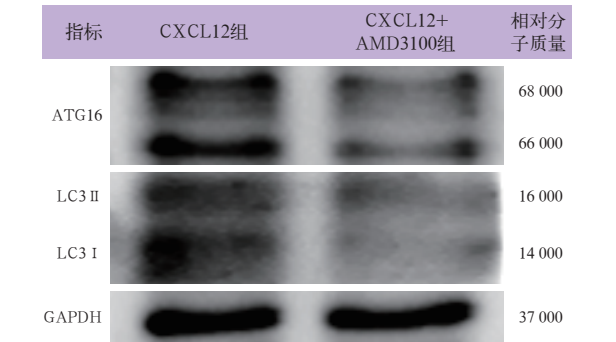
图 7 流式细胞仪检测 CXCL12 组和 CXCL12+AMD3100 组 OGD/R SH-SY5Y 细胞的凋亡情况

2.6 干扰 CXCR4 表达可抑制 OGD/R SH-SY5Y 细胞自噬及 AQP3 的表达: 与 siNC 组比较, siCXCR4 组细胞凋亡无明显变化 (1.103 ± 0.083 比 1, $P > 0.05$; 图 9), 自噬蛋白 LC3、ATG16、AQP3 和 CXCR4 的蛋白表达明显降低 (均 $P < 0.05$; 表 4; 图 10)。提示干扰 CXCR4 可以通过 AQP3 抑制 OGD/R SH-SY5Y 细胞的自噬。

表 3 CXCL12 组与 CXCL12+AMD3100 组 OGD/R SH-SY5Y 细胞 ATG16 和 LC3 的蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

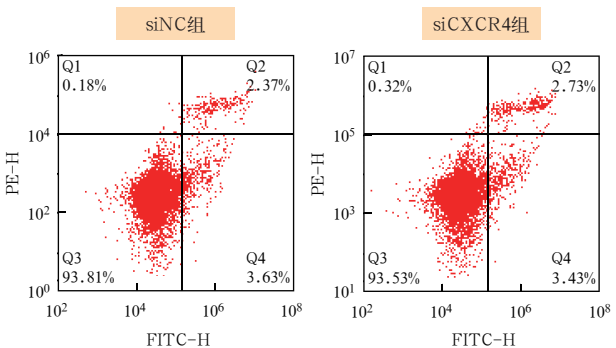
组别	孔数(孔)	ATG16/GAPDH	LC3/GAPDH
CXCL12 组	3	1.00±0.00	1.00±0.00
CXCL12+AMD3100 组	3	0.75±0.08 ^a	0.86±0.07 ^a

注: CXCL12 为趋化因子 C-X-C 基序配体 12, AMD3100 为 C-X-C 趋化因子受体 4 抑制剂普乐沙福, OGD/R 为氧糖剥夺 / 复氧, ATG16 为自噬相关蛋白 16, LC3 为微管相关蛋白 1 轻链 3, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶; 与 CXCL12 组比较, ^a $P<0.05$



注: CXCL12 为趋化因子 C-X-C 基序配体 12, AMD3100 为 C-X-C 趋化因子受体 4 抑制剂普乐沙福, OGD/R 为氧糖剥夺 / 复氧, ATG16 为自噬相关蛋白 16, LC3 为微管相关蛋白 1 轻链 3, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶

图 8 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测 CXCL12 组和 CXCL12+AMD3100 组 OGD/R SH-SY5Y 细胞 ATG16、LC3 蛋白表达



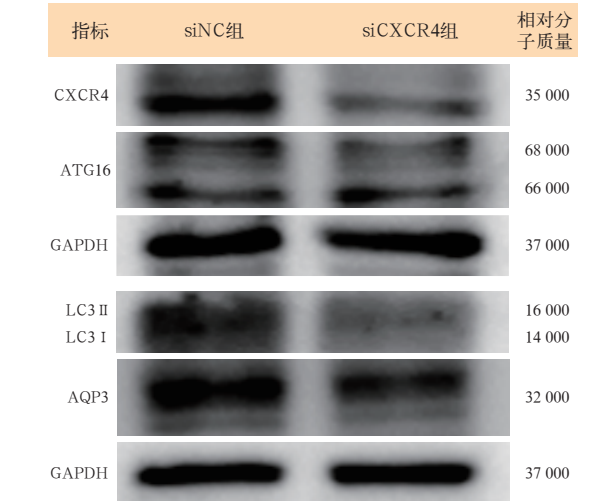
注: siNC 为阴性对照小干扰 RNA, siCXCR4 为 C-X-C 趋化因子受体 4 小干扰 RNA, OGD/R 为氧糖剥夺 / 复氧, PE 为藻红蛋白, FITC 为异硫氰酸荧光素

图 9 流式细胞仪检测 siNC 组和 siCXCR4 组 OGD/R SH-SY5Y 细胞的凋亡情况

表 4 siNC 组与 siCXCR4 组 OGD/R SH-SY5Y 细胞 ATG16、LC3、AQP3 和 CXCR4 的蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	孔数(孔)	ATG16/GAPDH	LC3/GAPDH	AQP3/GAPDH	CXCR4/GAPDH
siNC 组	3	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
siCXCR4 组	3	0.76±0.06 ^a	0.79±0.11 ^a	0.81±0.05 ^a	0.86±0.04 ^a

注: siNC 为阴性对照小干扰 RNA, siCXCR4 为 C-X-C 趋化因子受体 4 小干扰 RNA, OGD/R 为氧糖剥夺 / 复氧, ATG16 为自噬相关蛋白 16, LC3 为微管相关蛋白 1 轻链 3, AQP3 为水通道蛋白 3, CXCR4 为 C-X-C 趋化因子受体 4, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶; 与 siNC 组比较, ^a $P<0.05$



注: siNC 为阴性对照小干扰 RNA, siCXCR4 为 C-X-C 趋化因子受体 4 小干扰 RNA, OGD/R 为氧糖剥夺 / 复氧, CXCR4 为 C-X-C 趋化因子受体 4, ATG16 为自噬相关蛋白 16, LC3 为微管相关蛋白 1 轻链 3, AQP3 为水通道蛋白 3, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶

图 10 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测 siNC 组和 siCXCR4 组 OGD/R SH-SY5Y 细胞 CXCR4、ATG16、LC3、AQP3 蛋白表达

3 讨论

缺血性脑卒中是导致人类死亡的主要病因之一,也是全球面临的重大健康挑战^[26]。尽管重组组织型纤溶酶原激活剂(recombinant tissue-type plasminogen activator, rtPA)治疗急性缺血性脑卒中有效,但其应用受限于狭窄的治疗时间窗及再灌注损伤,因此迫切需要开发新的治疗手段和寻找有效的分子靶点^[27-28]。值得注意的是,缺血性脑卒中后出现的炎症反应是缺血性脑卒中神经元损伤的主要机制之一^[29]。在本研究中,我们发现体外的脑缺血 / 再灌注模型导致神经元细胞 SH-SY5Y 细胞凋亡增加,抑制了细胞的自噬,在 OGD/R SH-SY5Y 细胞中也抑制了 CXCL12 受体 CXCR4 的表达。表明 OGD/R 模型有可能通过 CXCL12/CXCR4 信号轴影响脑缺血 / 再灌注神经元的凋亡和自噬。值得注意的是,OGD/R 也抑制了 SH-SY5Y 细胞中 AQP3 蛋白的表达,推测 CXCL12/CXCR4 可能是通过 AQP3 发挥信号转导作用。

为进一步验证 CXCL12 在体外脑缺血 / 再灌注模型中的作用,本研究在 OGD/R SH-SY5Y 细胞中加入 rhCXCL12,对细胞的自噬和凋亡进行检测,结果表明, CXCL12 促进了 OGD/R SH-SY5Y 细胞的自噬,但是对凋亡没有明显的影响。有研究报道, CXCL12 可以促进面神经损伤神经细胞的自噬,对凋亡没有影响,与本研究结果相似^[19]。目前多种研究结果支

持 CXCL12 可以促进自噬^[18, 30-31], 然而 CXCL12 对细胞凋亡的影响尚存在争议。例如, 沉默 CXCL12 的表达可以抑制肾足细胞的凋亡, 对肾足细胞的损伤具有保护作用^[32]。外源性的 CXCL12 刺激可以诱导乳腺癌细胞中凋亡蛋白的表达, 诱导细胞凋亡^[33]。然而在蛛网膜下腔出血中外源性 CXCL12 可以发挥抗凋亡作用, 并且这种抗凋亡作用可以被 AMD3100 阻断^[34]。此外, 在创伤性脑损伤模型中也有关于 CXCL12 抑制神经元凋亡的报道, 并且抗凋亡作用也可以被 AMD3100 逆转^[35]。有趣的是, 内源性 CXCL12 的作用存在差异。尤其是针对细胞死亡方面, 存在抑制凋亡和诱导凋亡两种作用^[33]。因此, 在不同细胞中、不同作用时间等环境下, CXCL12 对脑卒中神经元凋亡的影响有待进一步探究。我们发现加入外源性 CXCL12 后, 促进了 OGD/R SH-SY5Y 神经细胞中 CXCL12 受体 CXCR4 及 AQP3 的表达。表明在 OGD/R SH-SY5Y 神经细胞中, CXCL12 影响了 CXCR4 的表达, 且 CXCL12/CXCR4 信号轴可能通过 AQP3 发挥信号转导作用。

为探究 CXCL12 是否通过 CXCR4 发挥作用, 本研究使用 CXCR4 特异性抑制剂 AMD3100 对 OGD/R SH-SY5Y 神经细胞进行处理, 结果显示, AMD3100 逆转了 CXCL12 的促自噬作用, 同样对凋亡没有明显影响。说明 CXCL12 确实通过 CXCR4 诱导 OGD/R SH-SY5Y 神经细胞的自噬。目前有研究证明, CXCL12/CXCR4 信号轴可以诱导自噬, 例如 CXCL12/CXCR4 可以通过诱导结直肠癌的自噬来促进细胞的侵袭和耐药性^[31]。激活 CXCL12/CXCR4 信号通路可以促进 AML 的自噬^[20]。但是鲜见 CXCL12/CXCR4 信号轴对缺血性脑卒中神经元自噬的相关研究, 因此本研究探讨 CXCL12/CXCR4 对缺血性脑卒中神经元自噬的影响显得非常重要。

为进一步确认 CXCR4 在 OGD/R SH-SY5Y 神经细胞中的作用及下游通路, 本研究干扰 SH-SY5Y 神经细胞 CXCR4 的表达后建立 OGD/R 模型, 检测 SH-SY5Y 细胞的自噬、凋亡以及下游通路蛋白 AQP3 的表达, 结果显示, 干扰 CXCR4 后确实抑制了 OGD/R SH-SY5Y 细胞的自噬, 同样对凋亡没有明显影响。干扰 CXCR4 后, 进一步证明 CXCL12/CXCR4 信号轴确实可以促进 OGD/R SH-SY5Y 细胞的自噬。重要的是, 干扰 CXCR4 后也抑制了 AQP3 的表达, 表明 CXCL12/CXCR4 信号轴是通过下游通

路蛋白 AQP3 发挥作用, 诱导脑缺血 / 再灌注后的神经元自噬。有研究显示, 在缺血性脑卒中后 6 h, 梗死灶的核心区 AQP3 的表达量降低, 且表达于星形胶质细胞和神经元细胞上^[36]。证明 AQP3 在缺血性脑卒中中发挥作用, 但是相关研究很少。然而, 目前鲜见关于 CXCL12/CXCR4 信号轴通过 AQP3 对脑缺血脑卒中神经元损伤影响的研究。本研究首次证明了 CXCL12/CXCR4/AQP3 信号通路可以诱导脑缺血 / 再灌注神经元的自噬, 具有一定的创新性。但是不足的是, CXCL12/CXCR4/AQP3 信号通路的体内实验也需要进一步进行验证。

综上所述, 本实验证明了 CXCL12/CXCR4 信号轴可以通过 AQP3 促进 OGD/R SH-SY5Y 细胞的自噬, 不影响细胞的凋亡, 表明 CXCL12/CXCR4/AQP3 在缺血性脑卒中中发挥重要作用, 为缺血性脑卒中的治疗提供了潜在的治疗靶点。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突

作者贡献声明 孟海宁: 酝酿和设计实验、实施研究、采集数据、起草文章; 贾超: 酝酿和设计实验、分析 / 解释数据; 李庆淑: 对文章的知识性内容作批评性审阅、统计分析; 谢伟峰: 行政、技术或材料支持; 王素梅: 支持性贡献; 曲彦: 酝酿和设计实验、获取研究经费、指导

参考文献

- [1] Kryczek I, Wei S, Keller E, et al. Stroma-derived factor (SDF-1/CXCL12) and human tumor pathogenesis [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007, 292 (3): C987-C995. DOI: 10.1152/ajpcell.00406.2006.
- [2] Stumm R, Höllt V. CXCR4 chemokine receptor 4 regulates neuronal migration and axonal pathfinding in the developing nervous system: implications for neuronal regeneration in the adult brain [J]. *J Mol Endocrinol*, 2007, 38 (3): 377-382. DOI: 10.1677/JME-06-0032.
- [3] Wang YT, Huang J, Li YN, et al. Roles of chemokine CXCL12 and its receptors in ischemic stroke [J]. *Curr Drug Targets*, 2012, 13 (2): 166-172. DOI: 10.2174/138945012799201603.
- [4] 张建起, 李晓红, 张赛, 等. 基质细胞衍生因子-1 α 交联层粘连蛋白诱导神经干细胞体外迁移与分化 [J]. *中华危重病急救医学*, 2017, 29 (1): 57-60. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2017.01.012.
- [5] Duan XX, Zhang GP, Wang XB, et al. The diagnostic and prognostic value of serum CXCL12 levels in patients with ischemic stroke [J]. *Neurol Sci*, 2015, 36 (12): 2227-2234. DOI: 10.1007/s10072-015-2341-8.
- [6] Shen J, Chen B, Zheng GR, et al. Detection of high serum concentration of CXCR4 chemokine ligand-12 in acute intracerebral hemorrhage [J]. *Clin Chim Acta*, 2017, 471: 55-61. DOI: 10.1016/j.cca.2017.05.022.
- [7] Xie KL, Cai Y, Yang P, et al. Upregulating microRNA-874-3p inhibits CXCL12 expression to promote angiogenesis and suppress inflammatory response in ischemic stroke [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2020, 319 (3): C579-C588. DOI: 10.1152/ajpcell.00001.2020.
- [8] Teicher BA, Fricker SP. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16 (11): 2927-2931. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2329.
- [9] Wu KJ, Yu SJ, Shia KS, et al. A novel CXCR4 antagonist CX549 induces neuroprotection in stroke brain [J]. *Cell Transplant*, 2017, 26 (4): 571-583. DOI: 10.3727/096368916X693563.

- [10] Selvaraj UM, Ortega SB, Hu R, et al. Preconditioning-induced CXCL12 upregulation minimizes leukocyte infiltration after stroke in ischemia-tolerant mice [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2017, 37 (3): 801–813. DOI: 10.1177/0271678X16639327.
- [11] Sun B, Ou H, Ren F, et al. Propofol inhibited autophagy through $\text{Ca}^{2+}/\text{CaMK}\beta/\text{AMPK/mTOR}$ pathway in OGD/R-induced neuron injury [J]. *Mol Med*, 2018, 24 (1): 58. DOI: 10.1186/s10020-018-0054-1.
- [12] Wang GY, Wang TZ, Zhang YY, et al. Schizandrin protects against OGD/R-induced neuronal injury by suppressing autophagy: involvement of the AMPK/mTOR pathway [J]. *Molecules*, 2019, 24 (19): 3624. DOI: 10.3390/molecules24193624.
- [13] 李世欣, 饶欧阳, 朱宁, 等. 6-姜烯酚通过调控微小 RNA-26a-5p/DAPK1 减轻脑缺血 / 再灌注损伤的机制研究 [J]. *中华危重病急救医学*, 2024, 36 (6): 616–623. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20240111-00031.
- [14] Zhang Y, Zhang Y, Jin XF, et al. The role of astragaloside IV against cerebral ischemia/reperfusion injury: suppression of apoptosis via promotion of P62-LC3-autophagy [J]. *Molecules*, 2019, 24 (9): 1838. DOI: 10.3390/molecules24091838.
- [15] Sun XW, Wang DY, Zhang TT, et al. Eugenol attenuates cerebral ischemia-reperfusion injury by enhancing autophagy via AMPK-mTOR-P70S6K pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 84. DOI: 10.3389/fphar.2020.00084.
- [16] Liu T, Han S, Dai QQ, et al. IL-17A-mediated excessive autophagy aggravated neuronal ischemic injuries via Src-PP2B-mTOR pathway [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 2952. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02952.
- [17] Chen Z, Teo AE, McCarty N. ROS-induced CXCR4 signaling regulates mantle cell lymphoma (MCL) cell survival and drug resistance in the bone marrow microenvironment via autophagy [J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22 (1): 187–199. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-0987. Erratum in: *Clin Cancer Res*, 2017, 23 (7): 1875–1876. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-3202.
- [18] Yang JW, Zhang YF, Wan CY, et al. Autophagy in SDF-1 α -mediated DPSC migration and pulp regeneration [J]. *Biomaterials*, 2015, 44: 11–23. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2014.12.006.
- [19] Gao DK, Tang TC, Zhu J, et al. CXCL12 has therapeutic value in facial nerve injury and promotes Schwann cells autophagy and migration via PI3K-AKT-mTOR signal pathway [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 124: 460–468. DOI: 10.1016/j.jbiomac.2018.10.212.
- [20] Hu XJ, Mei S, Meng WF, et al. CXCR4-mediated signaling regulates autophagy and influences acute myeloid leukemia cell survival and drug resistance [J]. *Cancer Lett*, 2018, 425: 1–12. DOI: 10.1016/j.canlet.2018.03.024.
- [21] Yamamoto N, Yoneda K, Asai K, et al. Alterations in the expression of the AQP family in cultured rat astrocytes during hypoxia and reoxygenation [J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 2001, 90 (1): 26–38. DOI: 10.1016/S0169-328X(01)00064-X.
- [22] Chen L, Li Z, Zhang Q, et al. Silencing of AQP3 induces apoptosis of gastric cancer cells via downregulation of glycerol intake and downstream inhibition of lipogenesis and autophagy [J]. *Oncotargets Ther*, 2017, 10: 2791–2804. DOI: 10.2147/OTT.S134016.
- [23] Xie H, Zhou L, Liu F, et al. Autophagy induction regulates aquaporin 3-mediated skin fibroblast ageing [J]. *Br J Dermatol*, 2022, 186 (2): 318–333. DOI: 10.1111/bjd.20662.
- [24] Hara-Chikuma M, Chikuma S, Sugiyama Y, et al. Chemokine-dependent T cell migration requires aquaporin-3-mediated hydrogen peroxide uptake [J]. *J Exp Med*, 2012, 209 (10): 1743–1752. DOI: 10.1084/jem.20112398.
- [25] 王雪颖, 孟海宁, 王松梅, 等. CXC 趋化因子受体 7 对缺血性卒中神经元细胞周期的影响 [J]. *中华危重病急救医学*, 2022, 34 (2): 151–155. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20211221-01898.
- [26] American Heart Association Stroke Council, Council on Cardiovascular and Stroke Nursing, Council on Clinical Cardiology, et al. Guidelines for adult stroke rehabilitation and recovery: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association [J]. *Stroke*, 2016, 47 (6): e98–e169. DOI: 10.1161/STR.0000000000000098. Erratum in: *Stroke*, 2017, 48 (2): e78. DOI: 10.1161/STR.0000000000000120. Erratum in: *Stroke*, 2017, 48 (12): e369. DOI: 10.1161/STR.0000000000000156.
- [27] Huang D, Liu HH, Qu Y, et al. Non-invasive remote ischemic postconditioning stimulates neurogenesis during the recovery phase after cerebral ischemia [J]. *Metab Brain Dis*, 2017, 32 (6): 1805–1818. DOI: 10.1007/s11011-017-0068-3.
- [28] Tawil SE, Muir KW. Thrombolysis and thrombectomy for acute ischaemic stroke [J]. *Clin Med (Lond)*, 2017, 17 (2): 161–165. DOI: 10.7861/clinmedicine.17-2-161.
- [29] Mehta SL, Manhas N, Raghubir R. Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics [J]. *Brain Res Rev*, 2007, 54 (1): 34–66. DOI: 10.1016/j.brainresrev.2006.11.003.
- [30] Ashley RL, Runyan CL, Maestas MM, et al. Inhibition of the C-X-C motif chemokine 12 (CXCL12) and its receptor CXCR4 reduces utero-placental expression of the VEGF system and increases utero-placental autophagy [J]. *Front Vet Sci*, 2021, 8: 650687. DOI: 10.3389/fvets.2021.650687.
- [31] Yu XF, Shi WN, Zhang YH, et al. CXCL12/CXCR4 axis induced miR-125b promotes invasion and confers 5-fluorouracil resistance through enhancing autophagy in colorectal cancer [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 42226. DOI: 10.1038/srep42226.
- [32] Sha WG, Shen L, Zhou L, et al. Silencing of CXCL12 performs a protective effect on C5b-9-induced injury in podocytes [J]. *Int Urol Nephrol*, 2018, 50 (8): 1535–1544. DOI: 10.1007/s11255-018-1799-8.
- [33] Drury LJ, Wendt MK, Dwinell MB. CXCL12 chemokine expression and secretion regulates colorectal carcinoma cell anoikis through Bim-mediated intrinsic apoptosis [J]. *PLoS One*, 2010, 5 (9): e12895. DOI: 10.1371/journal.pone.0012895.
- [34] Gu R, Wang L, Zhou H, et al. Rh-CXCL-12 attenuates neuronal pyroptosis after subarachnoid hemorrhage in rats via regulating the CXCR4/NLRP1 pathway [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 6966394. DOI: 10.1155/2021/6966394.
- [35] Mao WF, Yi X, Qin JB, et al. CXCL12 inhibits cortical neuron apoptosis by increasing the ratio of Bcl-2/Bax after traumatic brain injury [J]. *Int J Neurosci*, 2014, 124 (4): 281–290. DOI: 10.3109/00207454.2013.838236.
- [36] Yang M, Gao F, Liu H, et al. Temporal changes in expression of aquaporin-3, -4, -5 and -8 in rat brains after permanent focal cerebral ischemia [J]. *Brain Res*, 2009, 1290: 121–132. DOI: 10.1016/j.brainres.2009.07.018.

(收稿日期: 2024-12-15)

(本文编辑: 张耘菲)

关于经过广告审批后的广告中存在不规范医学名词术语未予更改的声明

依照广告审批的相关规定,按照广告厂家的要求,本刊刊登的伊力佳广告图片和内容均按照广告审查批准文件的原件刊出,故广告内容中“适应症”“禁忌症”未按标准医学名词术语修改为“适应证”“禁忌证”。特此声明!

(本刊编辑部)