

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2026.11.005
文章编号: 1005-8982 (2026) 11-0031-12

实验研究·论著

EFhd2和ATG16L1在二乙酰吗啡致神经元自噬中的作用研究*

戴晨璐¹, 刘静宇¹, 苏丽萍^{2,3}, 季敏², 刘轩铭¹, 程明¹, 梁敏¹, 蒲红伟^{4,5}

(1.新疆医科大学基础医学院,新疆乌鲁木齐830017; 2.新疆医科大学第一附属医院病理科,新疆乌鲁木齐830054; 3.广东省脑连接图谱重点实验室,广东深圳518055; 4.新疆医科大学第一附属医院科技管理科,新疆乌鲁木齐830054; 5.新疆医科大学法医学重点实验室,新疆乌鲁木齐830011)

摘要: **目的** 探讨EF-Hand结构域家族成员2(EFhd2)和自噬相关蛋白16L1(ATG16L1)在二乙酰吗啡致神经元自噬中的作用。**方法** 12只雄性SD大鼠随机分为对照组和模型组,每组6只。模型组腹腔注射二乙酰吗啡,连续20 d,复制二乙酰吗啡成瘾模型;对照组注射生理盐水。取大鼠脑组织,蛋白质组学测序筛选差异蛋白,苏木精-伊红(HE)染色观察脑组织形态学改变,以及自噬蛋白表达水平变化。采用CCK-8法检测二乙酰吗啡干预细胞的最适浓度及细胞吸光度值;Western blotting检测EFhd2、ATG16L1及自噬相关蛋白P62、LC3蛋白水平;构建EFhd2敲低原代大鼠皮质神经元,Western blotting检测验证转染效率;GFP-RFP-LC3双荧光慢病毒检测神经元自噬通量;蛋白质作用位点预测,以及免疫共沉淀(CO-IP)验证EFhd2和ATG16L1相互作用。使用Peretinoin激活ATG16L1后检测细胞存活率及自噬水平。**结果** 蛋白质组学筛选出差异蛋白,在差异显著的蛋白中通过与自噬数据库交互确定研究主因子为EFhd2。HE染色结果显示,模型组相对于对照组大鼠脑组织染色较浅,细胞核数量减少。Western blotting检测结果显示,对照组P62蛋白相对表达量高于模型组($P < 0.05$),LC3 II/I、EFhd2和ATG16L1蛋白相对表达量均低于模型组($P < 0.05$)。体外细胞实验显示,二乙酰吗啡干预神经元细胞后,与空载病毒对照组比较,DA组细胞吸光度值降低($P < 0.05$),自噬相关蛋白相对表达量升高($P < 0.05$);而敲低EFhd2后使用二乙酰吗啡干预后,与DA组比较,shEFhd2+DA组细胞吸光度值升高($P < 0.05$),自噬蛋白相对表达量下降($P < 0.05$),自噬水平降低($P < 0.05$)。蛋白质相互作用预测及CO-IP结果显示,EFhd2和ATG16L1存在相互作用。激活ATG16L1后,与shEFhd2+DA组比较,shEFhd2+Peretinoin+DA组细胞吸光度值降低($P < 0.05$),自噬水平升高($P < 0.05$)。**结论** EFhd2、ATG16L1参与了二乙酰吗啡致神经元自噬过程,干预EFhd2表达可降低二乙酰吗啡致神经元自噬水平,为神经系统疾病防治提供新靶点。

关键词: 二乙酰吗啡;自噬;EF-Hand结构域家族成员2;自噬相关蛋白16L1

中图分类号: R749.6

文献标识码: A

Study on the role of EFhd2 and ATG16L1 in neuronal autophagy induced by diacetylmorphine*

Dai Chen-lu¹, Liu Jing-yu¹, Su Li-ping^{2,3}, Ji Min², Liu Xuan-ming¹, Cheng Ming¹, Liang Min¹, Pu Hong-wei^{4,5}

(1. School of Basic Medical Sciences, Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830017, China; 2. Department of Pathology, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830054, China; 3. Guangdong Provincial Key Laboratory of Brain Connectome and Behavior, Shenzhen, Guangdong 518055, China; 4. Department of Discipline Construction,

收稿日期: 2025-10-20

* 基金项目: 国家自然科学基金(82360256;82460257);广东省脑连接图谱重点实验室资助项目(2023B1212060055)

[通信作者] 蒲红伟, E-mail: 576250630@qq.com

The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830054, China; 5. Key Laboratory of Forensic Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830017, China)

Abstract: Objective To explore the roles of EF-Hand domain family member 2 (EFhd2) and Autophagy-related 16-like 1 (ATG16L1) in diacetylmorphine-induced neuronal autophagy. **Methods** Twelve male SD rats were randomly divided into a control group and a model group, with six rats in each group. The model group was intraperitoneally injected with diacetylmorphine for 20 consecutive days to establish a diacetylmorphine addiction model, while the control group was injected with saline. Rat brain tissues were collected for proteomic sequencing to screen differential proteins; HE staining was used to observe morphological changes in brain tissue; and changes in autophagy protein expression levels were assessed. CCK-8 was used to determine the optimal concentration and changes in cell viability following diacetylmorphine intervention; Western blotting was used to detect changes in the levels of EFhd2, ATG16L1, and autophagy-related proteicontrolP62 and LC3; primary rat cortical neurocontrolwith EFhd2 knockdown were prepared and transfection efficiency was verified by Western blot; GFP-RFP-LC3 dual-fluorescence lentivirus was used to detect neuronal autophagic flux; the protein interaction sites were predicted and EFhd2-ATG16L1 interaction was validated by CO-IP. After activating ATG16L1 with Peretinoin, cell survival rate and autophagy levels were measured. **Results** Proteomics identified differential proteins, and among the significantly different proteins, EFhd2 was determined to be the primary research factor through interaction with the autophagy database. HE staining results showed that the brain tissue of the model group showed weaker staining compared with the control group, with a reduced number of nuclei. Western blot results indicated significant differences in the levels of P62, LC3II/I, EFhd2, and ATG16L1 between the controlgroup and model group ($P < 0.05$); the control group had higher P62 levels than the model group ($P < 0.05$), while LC3II/I, EFhd2, and ATG16L1 levels were lower than those in the model group. In vitro cell experiments demonstrated that after diacetylmorphine intervention on neuronal cells, variance analysis showed statistically significant differences in cell viability and autophagy-related protein expression, with cell viability markedly decreased compared with the NC group ($P < 0.05$) and autophagy-related protein expression increased compared with the NC group ($P < 0.05$). Following EFhd2 knockdown with the use of diacetylmorphine intervention (shEFhd2 DA group), variance analysis indicated significant differences in cell viability and autophagy protein levels, with cell viability significantly higher than the diacetylmorphine treatment group (DA group) ($P < 0.05$) and autophagy protein expression lower compared with the DA group ($P < 0.05$), indicating reduced autophagy levels relative to the DA group. Protein interaction prediction and CO-IP results showed an interaction between EFhd2 and ATG16L1. After activation of ATG16L1, variance analysis of cell viability showed statistically significant differences, with cell viability reduced and autophagy levels increased relative to the shEFhd2 DA group ($P < 0.05$). **Conclusion** EFhd2 and ATG16L1 are involved in the neuronal autophagy process induced by diacetylmorphine. Modulating EFhd2 expression can reduce the level of diacetylmorphine-induced neuronal autophagy, providing a new target for the prevention and treatment of neurological diseases.

Keywords: diacetylmorphine; autophagy; EF-Hand domain family member 2; autophagy-related protein 16L1

二乙酰吗啡(海洛因)是一种具有高度成瘾性与危害性的阿片类毒品。根据《2024年中国毒情形势报告》^[1],全球吸毒人数在2022年已达2.92亿,过去十年间增长约20%,其中阿片类药物滥用占较大比例。截至2024年底,我国吸毒人员有74.7万,占全国人口总数的0.054%,其中,滥用海洛因等阿片类毒品的人员达41.6万人。这说明当前禁毒形势依然严峻。研究表明,急性高剂量二乙酰吗啡可诱导细胞产生显著的神经毒性效应^[2],包括诱导神经元

死亡^[3]。研究发现,二乙酰吗啡成瘾与脑神经元凋亡有密切关系^[4];长期二乙酰吗啡暴露可诱导大鼠大脑(包括顶叶、额叶、颞叶、枕叶、内嗅皮层、梨状皮层,以及海马CA1、CA2、CA3区)及脊髓特定区域神经元凋亡^[5]。体外实验表明,二乙酰吗啡处理可诱导PC-12细胞毒性,表现为细胞死亡及DNA片段化^[6]。通过对海洛因成瘾复吸大鼠相关脑区神经元超微结构的观察,发现从成瘾到脱毒治疗,最后到重新染毒的3个阶段,神经元的变化过程表现为从

水样变性(线粒体空泡化,轴突、树突肿胀、透亮)到紊状变性(轴质结构紊乱,轴突、树突神经微丝、微管崩解),最后到髓鞘板层分离、断裂^[7]。二乙酰吗啡成瘾可导致多种形式的神经元损伤,但其致神经元损伤的具体机制尚未完全阐明。

自噬是一种高度保守的溶酶体降解途径,对维持细胞稳态至关重要^[8]。自噬在感染、肿瘤、心血管疾病和神经退行性疾病等发病过程中都起着重要的作用^[9]。虽然自噬在一定程度上有助于清除细胞内的废物和损伤成分,但过度或异常的自噬活动则可能导致神经元的功能障碍和结构损伤,其具体的损伤机制尚未完全阐明,需深入研究。EF-Hand 结构域家族成员 2(EF-hand domain family member 2, EFhd2),亦称 Swiprosin-1,是一种广泛保守的 EF-Hand 结构域蛋白,参与调控细胞骨架动力学、囊泡转运、钙信号传导、应激反应及代谢通路等细胞过程^[10-11]。EFhd2 参与了多种神经疾病的发病过程,如帕金森病^[12]、阿尔茨海默病^[13]、精神分裂症^[14]等。自噬相关蛋白 16L1 (autophagy related 16-like 1, ATG16L1)是自噬过程中关键的调节因子之一,主要参与自噬小体的形成和成熟。其功能包括参与自噬小体的形成,清除细胞中损伤的细胞器,介导免疫反应,参与炎症调控,保护神经系统^[15]。自噬在神经系统疾病的发生、发展中有关键调控作用,但对二乙酰吗啡成瘾后神经元自噬的报道较少,其发生机制尚不明确。EFhd2 作为一种在神经系统中高表达的蛋白,其是否参与了神经元损伤过程,促进神经元自噬的过度激活,以及是否通过影响 ATG16L1 的表达发挥神经元损伤作用尚缺乏直接证据。

本研究通过生物信息学方法筛选出差异表达蛋白,联合自噬相关数据库分析,初步确定研究主因子及导致神经系统损伤的生物学过程;在动物模型中验证 EFhd2、ATG16L1 蛋白表达及自噬这一生物学过程的水平变化;在体外细胞模型中敲低 EFhd2 表达,观察细胞活力、自噬通量及 ATG16L1 表达的改变,以明确 EFhd2 是否通过调控 ATG16L1 影响神经元自噬水平。本研究旨在从生物信息学、体内外实验多层次揭示二乙酰吗啡成瘾致神经元损伤机制,为阿片类成瘾所致神经系统疾病的防治提供潜在新靶点。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选取 6~8 周龄、SPF 级 SD 雄性大鼠 12 只,体重(200±20)g,购买并饲养于新疆医科大学动物实验中心。实验动物生产许可证号:SCXK(新)2023-0001,实验动物使用许可证号:SYXK(新)2023-0004。动物饲养环境保持恒温(23±3)℃、相对湿度(50±10)%,光/暗周期为 12 h/12 h,所有大鼠均自由摄食饮水。动物实验均通过新疆医科大学第一附属医院动物实验医学伦理委员会审批同意(IACUC-JT-20250527-29)。

1.2 实验药物

本实验所用二乙酰吗啡由新疆维吾尔自治区公安厅禁毒总队提供,使用经相关部门审批备案。

1.3 实验试剂

1.3.1 抗体 兔抗 EFhd2 多克隆抗体(DF13872)购自江苏亲科生物研究中心有限公司,小鼠抗大鼠 ATG16L1 多克隆抗体(67943-1)、LC3B 特异性多克隆抗体(18725-1)、小鼠抗大鼠 GAPDH 单克隆抗体(60004-1)、辣根过氧化物酶 HRP 标记的山羊抗兔二抗(SA00001-2)、辣根过氧化物酶 HRP 标记的山羊抗鼠二抗(SA00001-1)均购自武汉三鹰生物技术有限公司,兔抗 P62 多克隆抗体(D6M5X)购自美国 Cell Signaling Technology 公司,小鼠抗大鼠 β III-tubulin 单克隆抗体(ab78078)购自英国 Abcam 公司。

1.3.2 试剂 苏木精-伊红(Hematoxylin and Eosin, HE)试剂盒(G1120)、尼氏染液(G1036)、高效 RIPA 裂解液(R0010)、青链霉素混合液(G4003)、0.25% 胰蛋白酶(G4001)均购自武汉赛维尔生物科技有限公司,沉默 EFhd2 慢病毒(ZBCX202412834)购自南京零号基因科技有限公司,GFP-RFP-LC3 慢病毒(10099936)购自上海吉凯基因医学科技股份有限公司,DMEM 培养基(C3103-0500)、胎牛血清(C04001-500)均购自上海龙田生物技术有限公司,嘌呤霉素(BL528A)购自北京兰杰柯科技有限公司,CCK-8 试剂盒(PF00004)购自武汉三鹰生物技术有限公司,3-MA(189490)购自美国 Sigma-Aldrich 公司;Peretinoin(HY-100008,口服非环状类视黄醇)购自美国 Med Chem Express 生物科技公司,TBST 洗涤缓冲液(G0004)购自武汉赛维尔生物科技有限公司;

戊巴比妥钠(P3761)购自美国Sigma-Aldrich公司。

1.4 实验仪器

二氧化碳(CO₂)恒温细胞培养箱、多功能酶标仪(美国Thermo公司)、电泳、电转盒(美国Bio-Rad公司)、倒置光学显微镜(德国Zeiss公司)、荧光显微镜(意大利Leica公司)。

1.5 动物实验检测自噬水平变化

1.5.1 二乙酰吗啡成瘾动物模型复制 结合参考文献^[6]及预实验结果,采用逐日剂量递增方法复制大鼠二乙酰吗啡成瘾模型。将12只雄性SD大鼠随机分为二乙酰吗啡模型组(模型组)与生理盐水对照组(对照组),各6只。模型复制方法如下:模型组大鼠皮下注射二乙酰吗啡,首日皮下注射药量为5 mg/kg,以后每日递增2 mg/kg,每日10:00、19:00各1次;对照组于相同时间点皮下注射等体积生理盐水(0.2 mL/次)。连续给药至第20天后,腹腔注射纳洛酮(0.8 mg/kg)催促戒断,观察大鼠30 min内戒断症状(如扭体、湿狗样抖动、跳跃、站立、齿颤、理毛行为及上睑下垂等)。若模型组大鼠出现典型戒断行为,则判定成瘾模型复制成功。

1.5.2 大鼠脑组织蛋白测序 大鼠经戊巴比妥钠麻醉后,采用颈动脉放血法处死,迅速取出全脑,于冰上分离大脑皮质组织,液氮速冻,随后置于-80℃冰箱保存待测;取约50 mg组织,置于含1 mmol苯甲基磺酰氟及蛋白酶抑制剂混合物的RIPA裂解液中,在冰上充分匀浆。匀浆液于4℃、12 000 r/min条件下离心20 min,小心吸取上清液。采用BCA法测定蛋白浓度。采用过滤器辅助蛋白质组样品制备法(FASP)对蛋白质进行酶解,随后使用TMT标记试剂盒对肽段进行标记。标记后的肽段利用高pH反相肽段分离试剂盒进行分级处理。采用纳升流速高效液相色谱系统(Easy nLC 1200)对分级后肽段进行分离,流动相包括A液(0.1%甲酸水溶液)和B液(0.1%甲酸乙腈溶液)。色谱柱平衡条件为95% A液,样品经自动进样器注入上样柱,再经分析柱分离。色谱分离结束后,采用Q-Exactive质谱仪进行质谱数据采集。采用Mascot 2.2搜索引擎,结合Proteome Discoverer 1.4软件平台,对质谱数据进行蛋白质鉴定与定量分析。

1.5.3 生物信息学分析 对模型组与对照组大鼠脑组织的蛋白质组学数据进行生物信息学分析。

首先,基于蛋白质表达强度计算差异倍数(fold change, FC)并进行*t*检验,以FC >1.2且P <0.05为阈值筛选差异表达蛋白质。将FC以2为底取对数(log₂FC)作为横坐标,P值以10为底取负对数(-log₁₀P)作为纵坐标,采用R语言“ggplot2”包绘制火山图。进一步以样品和蛋白质表达量作为2个维度,使用欧氏距离(Euclidean Distance)作为距离度量,平均连锁法(Average Linkage)进行聚类,并利用R语言“Complex Heatmap”包绘制层次聚类热图。

1.5.4 HE染色 对蛋白质组学分析剩余的组织样本进行石蜡切片制备与HE染色。将切片置于65℃烤箱烘烤1 h,经二甲苯I/II各脱蜡15 min,梯度乙醇脱水至水化,每步5 min。苏木精染液覆盖组织,染色3 min,流水冲洗后镜检,至细胞核呈蓝紫色、胞质近无色。伊红染液覆盖染色3 min,流水冲洗后镜检,至胞质呈红色或粉红色。随后依次经无水乙醇快速脱水、二甲苯透明,中性树胶封片。

1.5.5 Western blotting法 取脑组织,按RIPA裂解液与PMSF蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂体积比100:1比例加入裂解体系,冰上裂解后提取总蛋白。采用BCA蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。每孔上样20 μg总蛋白,经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,转印至PVDF膜。用5%脱脂牛奶室温封闭2 h,随后于4℃孵育一抗过夜(EFhd2 1:1 000、ATG16L1 1:2 000、P62 1:1 000、LC3B 1:5 000)。次日回收一抗,TBST洗涤3次,每次5 min,室温孵育山羊抗兔/鼠二抗(1:5 000)2 h。使用ECL化学发光液在显影仪中显影,采用Image J软件对条带进行灰度分析并计算蛋白相对表达量,每组实验独立重复3次,数据经Prism软件进行统计学分析与作图。

1.6 细胞实验检测自噬水平变化

1.6.1 原代皮质神经元的提取与培养 参照本课题组前期研究^[17]的方法,取出生后1 d的SD大鼠乳鼠,在无菌条件下迅速分离大脑皮质,置于预冷的D-Hanks平衡盐溶液中。仔细剥离软脑膜及血管,将皮质组织剪裁为1 mm×1 mm×1 mm的组织碎块,经木瓜蛋白酶(含DNA酶)37℃消化20 min,以含血清的DMEM/F12培养基终止消化。使用300目细胞筛网过滤获得单细胞悬液,4℃、1 000 r/min离心5 min后弃去上清液。根据实验需求,将细胞接种于多孔板(96孔板:5×10³/孔;6孔板:1×10⁵/孔)。

培养 24 h 后更换为维持培养基 (Neurobasal A 培养基, 添加 2% B27、1% 谷氨酰胺及阿糖胞苷), 此后每 24 h 半量换液。选取生长状态良好的细胞用于后续实验。

1.6.2 CCK-8 法检测细胞活力 将原代皮质神经元以 5×10^3 个/孔的细胞密度接种于 96 孔板, 每组设 6 个复孔, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。弃去原培养基, 按浓度梯度加入含 0、50、100、200、300、400、500 μg/mL 二乙酰吗啡的新鲜维持培养基, 继续培养 12 h。每孔加入 100 μL CCK-8 工作液, 37 °C 孵育 1 h 后, 使用酶标仪于 450 nm 波长下测定各孔吸光度, 根据细胞存活率确定二乙酰吗啡干预神经元的适宜浓度。

1.6.3 慢病毒转染技术敲低 EFhd2 表达 取对数生长期细胞, 以 1×10^5 个/孔的细胞密度接种于 6 孔板, 分为空载病毒对照组 (空载病毒对照) 及 shEFhd2#1 组、shEFhd2#2 组、shEFhd2#3 组 (不同敲低序列)。37 °C 培养 24 h 后, 每孔加入 40 μL 聚凝胺与 960 μL DMEM 完全培养基的混合液。根据病毒滴度计算需要病毒量, 分别加入相应慢病毒 (空载或靶向 EFhd2 的不同 shRNA 序列, 病毒滴度均为 1.08×10^8 TU/mL, MOI = 10)。37 °C 继续培养 16 h 后弃去含病毒培养基, 更换为含 6 μg/mL 嘌呤霉素的完全培养基进行筛选。此后隔日换液, 持续培养 14 d。

1.6.4 Western blotting 法检测相关蛋白表达 收集细胞沉淀, 提取蛋白并通过 Western blotting 验证 EFhd2 敲低效率 (Western blotting 同 1.5.5), 选取敲低效果最显著的 shRNA 序列用于后续实验 (shEFhd2+DA 组)。

后续实验将细胞分为空白对照组 (未转染任何病毒、未加任何干预)、空载病毒对照组、DA 组 (空载病毒对照组仅加入二乙酰吗啡干预 12 h)、shEFhd2+DA 组 (敲低 EFhd2 后加二乙酰吗啡干预)。

1.6.5 GFP-RFP-LC3 双标慢病毒检测自噬流 将空载病毒对照组、DA 组及 shEFhd2+DA 组细胞接种于 24 孔板, 培养 24 h。次日, 根据病毒滴度与细胞数计算所需病毒量, 吸弃原培养基, 更换为含 GFP-RFP-LC3 慢病毒 (MOI = 10) 及 40 μL 聚凝胺的新鲜培养基。感染 16 h 后更换为完全培养基继续培养。待细胞生长至适宜密度时, 加入二乙酰吗啡 (200 μg/mL) 干预 12 h。在荧光显微镜下观察细胞

自噬通量变化。

1.6.6 采用 AlphaFold3 预测 EFhd2 和 ATG16L1 的作用位点 从 PDB 数据库中下载蛋白文件, 对 EFhd2 和 ATG16L1 蛋白分别进行去水、加氢、加电荷等处理, 使用 AutoDock Vina 进行精细优化, 观察大致接触区域, 运行对接, 使用 PyMOL 显示蛋白链、相互作用残基、氢键, 最后导出图像。

1.6.7 免疫共沉淀 (Co-IP) 技术检测 EFhd2 与 ATG16L1 的相互作用 收集细胞沉淀, 加入含苯甲基磺酰氟和磷酸酶抑制剂的裂解液提取总蛋白。取适量裂解液与蛋白 A/G 琼脂糖珠在室温孵育 1 h, 4 °C 条件下, 2 439 r/min 离心 5 min 去除珠子, 获得预澄清裂解液。将 EFhd2 抗体、ATG16L1 抗体及同型 IgG (阴性对照) 分别加入各预澄清裂解液样本中, 4 °C 孵育过夜。随后加入经预洗的蛋白 A/G 珠子, 室温孵育 2 h。用洗涤缓冲液清洗珠子 3 次 (每次 4 °C、2 439 r/min 离心 5 min, 弃去上清液), 最后加入 SDS 上样缓冲液, 100 °C 金属浴加热 8 min 洗脱复合物。离心后取上清液, 采用 Western blotting 检测 EFhd2 和 ATG16L1 的相互作用 (方法同 1.5.5)。

1.6.8 ATG16L1 激活剂 Peretinoin 恢复试验 在 shEFhd2 组细胞中加入 5 μmol Peretinoin 处理 24 h, 以恢复 ATG16L1 蛋白表达。随后通过 CCK-8 法检测细胞活力, Western blotting 检测 ATG16L1 及自噬相关蛋白 (如 P62、LC3 II/I) 的表达, 从而评估 ATG16L1 在 EFhd2 调控自噬过程中的作用。分组为空载病毒对照组、DA 组、shEFhd2+DA 组、shEFhd2+Peretinoin+DA 组 (敲低 EFhd2 后加 Peretinoin 再加二乙酰吗啡干预)。

1.7 统计学方法

数据分析采用 GraphPad Prism 10.0 统计软件。计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用 *t* 检验或方差分析, 两两比较用 Tukey 法。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 差异蛋白 EFhd2 与自噬的关系

蛋白质测序结果分析后得到差异蛋白, 将差异蛋白与自噬数据库进行交互, 结果显示 EFhd2 为共同表达的蛋白质, 在自噬数据库中检索发现 EFhd2 与自噬相关蛋白 ATG16L1 有直接调控关系。见图 1。

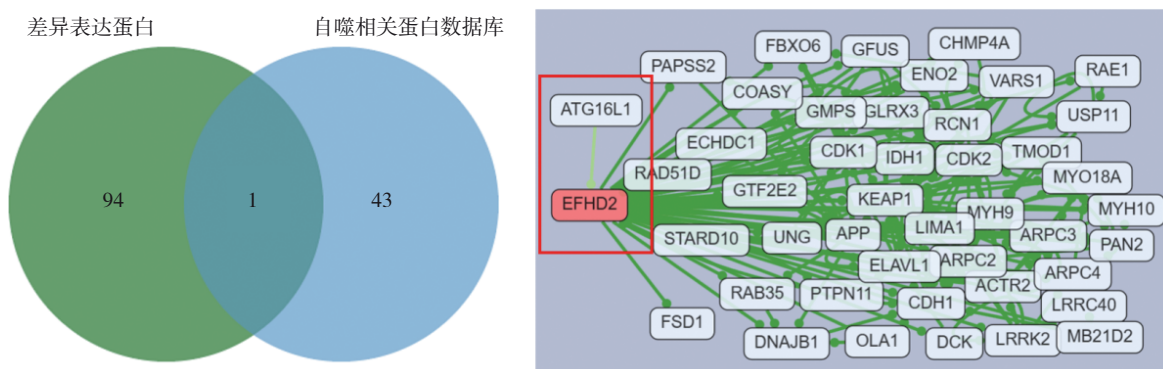


图 1 韦恩图(左)和EFhd2、ATG16L1调控关系(右)

2.2 二乙酰吗啡对大鼠脑组织形态学的影响

HE染色结果显示:对照组大鼠的脑组织形态正

常,细胞数量较多,排列整齐;模型组大鼠的脑组织细胞数量减少,排列紊乱,细胞核形态消失。见图2。

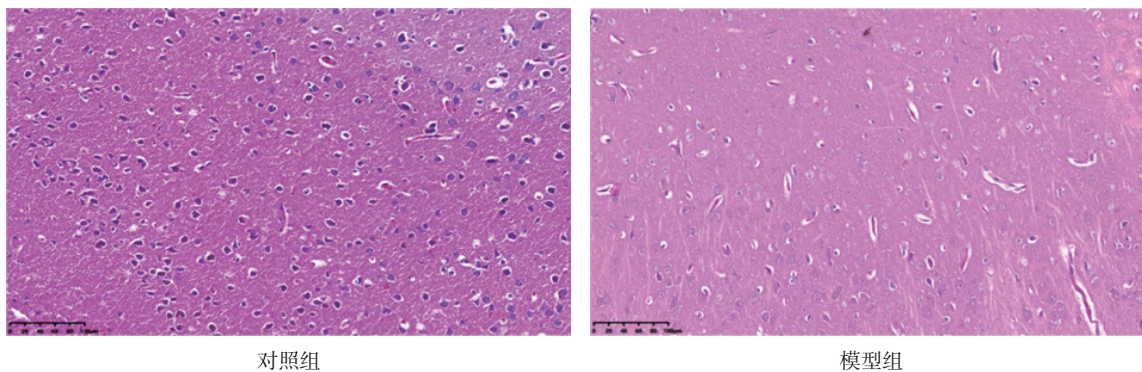


图 2 对照组与模型组大鼠脑组织病理形态 (光学显微镜×200)

2.3 二乙酰吗啡对大鼠脑组织自噬水平的影响

Western blotting检测结果显示:对照组与模型组的P62、LC3 II/I、EFhd2、ATG16L1蛋白相对表达量比较,经t检验,差异均有统计学意义($P < 0.05$);对照组P62蛋白相对表达量高于模型组($P < 0.05$),LC3 II/I、EFhd2、ATG16L1蛋白相对表达量均低于模型组。见图3和表1。

表 1 对照组和模型组大鼠脑组织相关蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	P62	LC3 II/I	EFhd2	ATG16L1
对照组	0.92 ± 0.05	0.24 ± 0.04	0.65 ± 0.07	0.64 ± 0.08
模型组	0.65 ± 0.03	0.90 ± 0.08	1.00 ± 0.15	1.00 ± 0.18
t值	2.952	13.02	3.686	3.191
P值	0.001	0.000	0.021	0.033

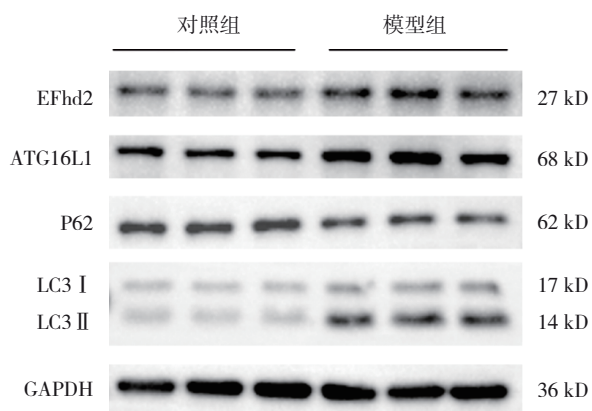
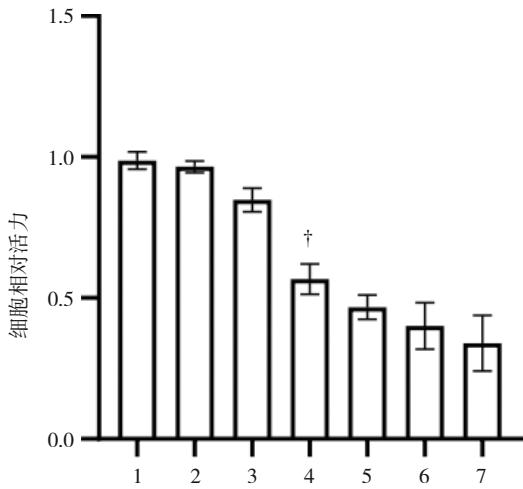


图 3 对照组与模型组大鼠脑组织相关蛋白表达

2.4 二乙酰吗啡对神经元细胞活力的影响

CCK-8结果显示:0、50、100、200、300、400、500 μg/mL二乙酰吗啡干预神经元细胞12 h后,各个浓度的细胞吸光度分别为(0.987 ± 0.025)、(0.965 ± 0.017)、(0.848 ± 0.034)、(0.567 ± 0.044)、(0.467 ± 0.035)、(0.401 ± 0.068)、(0.340 ± 0.081)。不同浓度的二乙酰吗啡干预神经元细胞12 h后,细胞吸光度均有所下降,当二乙酰吗啡浓度为200 μg/mL时,细胞吸光度为0.5左右,与0 μg/mL相比,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图4。

因此,后续实验选择二乙酰吗啡浓度200 μg/mL,干预12 h。



1: 0 μg/mL; 2: 50 μg/mL; 3: 100 μg/mL; 4: 200 μg/mL; 5: 300 μg/mL; 6: 400 μg/mL; 7: 500 μg/mL。†: 与 0 μg/mL 比较, $P < 0.05$ 。

图 4 不同浓度二乙酰吗啡对神经元细胞活力的影响

2.5 二乙酰吗啡对神经元细胞 EFhd2、ATG16L1、P62、LC3 蛋白表达的影响

Western blotting 检测结果显示: 空白对照组与 DA 组的 P62、LC3 II/I、EFhd2 和 ATG16L1 蛋白相对表达量比较, 经 t 检验, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 空白对照组 P62 蛋白相对表达量高于 DA 组 ($P < 0.05$), LC3 II/I、EFhd2 和 ATG16L1 蛋白相对表达量均低于 DA 组。见图 5 和表 2。

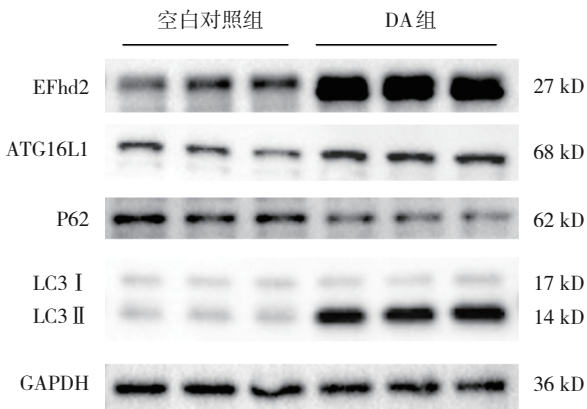


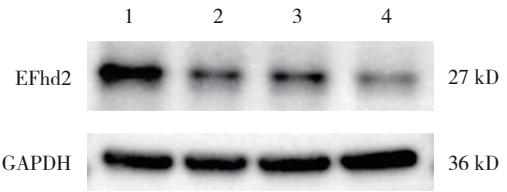
图 5 空白对照组与 DA 组神经元细胞相关蛋白表达

表 2 空白对照组与 DA 组神经元细胞相关蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	EFhd2	ATG16L1	P62	LC3 II/I
空白对照组	0.65 ± 0.04	0.57 ± 0.02	0.97 ± 0.02	0.64 ± 0.01
DA 组	1.13 ± 0.02	0.81 ± 0.09	0.61 ± 0.04	1.02 ± 0.02
t 值	6.908	4.111	14.51	21.94
P 值	0.000	0.014	0.000	0.000

2.6 EFhd2 对二乙酰吗啡干预后神经元细胞活力及自噬通量的影响

通过转染敲低 EFhd2 的慢病毒干预细胞中 EFhd2 蛋白表达, 结果显示: 空载病毒对照组、shEFhd2#1 组、shEFhd2#2 组和 shEFhd2#3 组的 EFhd2 蛋白相对表达量分别为 (1.27 ± 0.01)、(0.95 ± 0.12)、(0.88 ± 0.05)、(0.65 ± 0.08), 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 30.271, P = 0.000$); shEFhd2#1 组、shEFhd2#2 组和 shEFhd2#3 组的 EFhd2 蛋白相对表达量均低于空载病毒对照组 ($P < 0.05$)。见图 6。

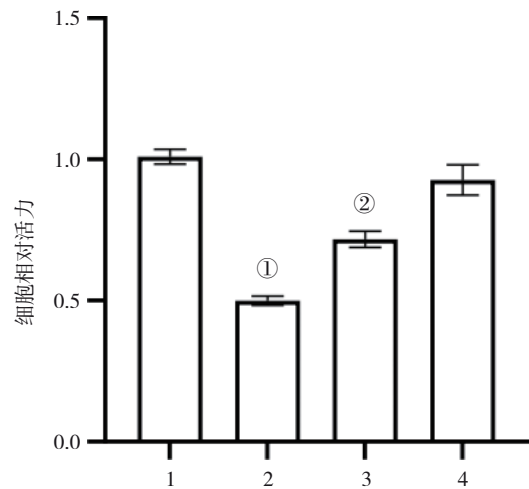


1: 空载病毒对照组; 2: shEFhd2#1 组; 3: shEFhd2#2 组; 4: shEFhd2#3 组。

图 6 原代神经元敲低 EFhd2 的蛋白表达

CCK-8 实验结果显示: 空载病毒对照组、DA 组、shEFhd2+DA 组、shEFhd2 组细胞吸光度分别为 (1.020 ± 0.029)、(0.503 ± 0.012)、(0.753 ± 0.020)、(0.958 ± 0.038), 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 219.500, P = 0.000$); DA 组细胞吸光度低于空载病毒对照组, shEFhd2+DA 组细胞吸光度高于 DA 组 ($P < 0.05$)。见图 7。

GFP-RFP-LC3 慢病毒检测自噬通量结果显示: 空载病毒对照组、DA 组、shEFhd2+DA 组自噬水平比



1: 空载病毒对照组; 2: DA 组; 3: shEFhd2+DA 组; 4: shEFhd2 组。①与空载病毒对照组比较, $P < 0.05$; ②与 DA 组比较, $P < 0.05$ 。

图 7 空载病毒对照组、DA 组、shEFhd2+DA 组、shEFhd2 组神经元细胞活力比较

较,经方差分析,差异有统计学意义($F=41.128, P=0.000$); DA 组自噬水平高于空载病毒对照组,

shEFhd2+DA 组自噬水平低于 DA 组($P < 0.05$)。见图 8。

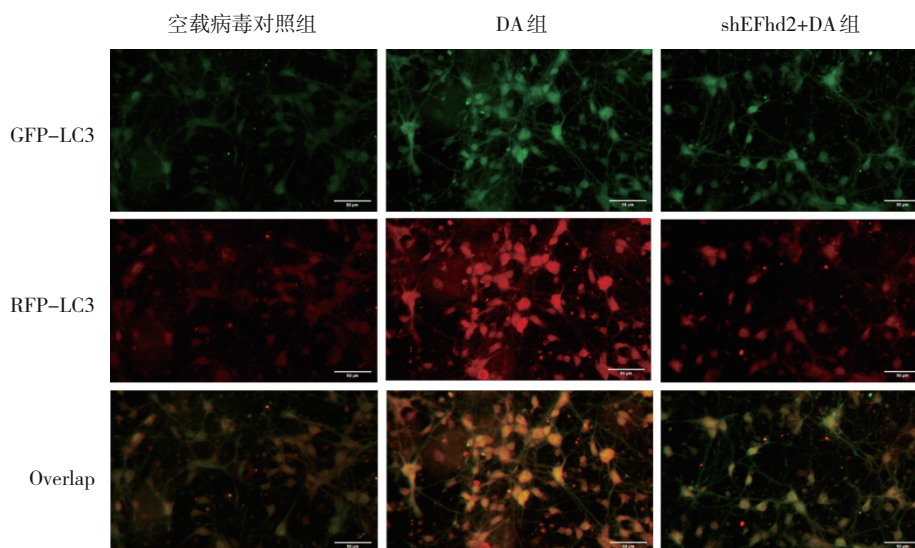


图 8 空载病毒对照组、DA 组、shEFhd2+DA 组神经元细胞自噬通量变化 (荧光显微镜 $\times 400$)

2.7 EFhd2 对二乙酰吗啡干预后神经元细胞 ATG16L1、P62、LC3 蛋白表达的影响

Western blotting 检测结果显示:空载病毒对照组、DA 组、shEFhd2+DA 组细胞的 EFhd2、ATG16L1、P62、LC3 II / I 蛋白相对表达量比较,经方差分析,差异均有统计学意义($P < 0.05$); DA 组 P62 蛋白相对表达量低于空载病毒对照组,EFhd2、ATG16L1、LC3 II / I 蛋白相对表达量均高于空载病毒对照组; shEFhd2+DA 组细胞 P62 蛋白相对表达量高于 DA 组,EFhd2、ATG16L1、LC3 II / I 蛋白相对表达量均低于 DA 组($P < 0.05$)。见表 3 和图 9。

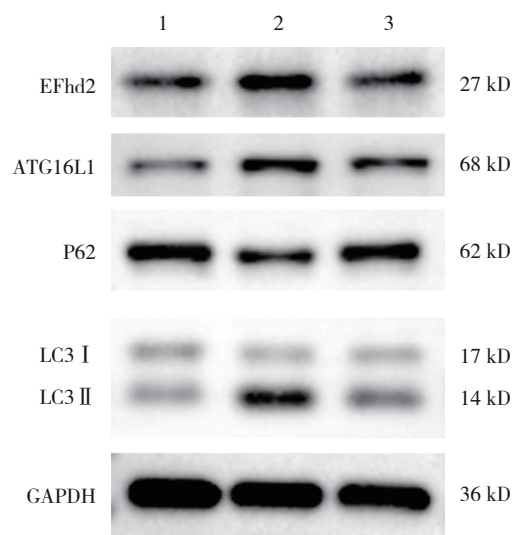
表 3 空载病毒对照组、DA 组、shEFhd2+DA 组神经元细胞相关蛋白表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	EFhd2	ATG16L1	P62	LC3 II / I
空载病毒对照组	0.80 \pm 0.10	0.84 \pm 0.10	1.35 \pm 0.04	0.42 \pm 0.01
DA 组	1.09 \pm 0.14 ^①	1.08 \pm 0.05 ^①	0.95 \pm 0.06 ^①	1.01 \pm 0.04 ^①
shEFhd2+DA 组	0.92 \pm 0.11 ^②	0.89 \pm 0.06 ^②	1.29 \pm 0.07 ^②	0.77 \pm 0.01 ^②
F 值	3.956	8.107	33.690	413.000
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注: ①与空载病毒对照组比较, $P < 0.05$; ②与 DA 组比较, $P < 0.05$ 。

2.8 EFhd2 与 ATG16L1 相互作用

使用蛋白互作预测工具 AlphaFold3 预测 EFhd2 和 ATG16L1 之间作用位点,结果发现两者间存在相



1: 空载病毒对照组; 2: DA 组; 3: shEFhd2+DA 组。

图 9 空载病毒对照组、DA 组、shEFhd2+DA 组神经元细胞相关蛋白表达

互作用。见图 10。

CO-IP 实验结果显示,使用 EFhd2 抗体进行沉淀后,Western blotting 检测到 ATG16L1 蛋白(左图 EFhd2/IP 泳道);反之,使用 ATG16L1 抗体沉淀后,亦检测到 EFhd2 蛋白(右图 ATG16L1/IP 泳道)。两组实验中,Input 泳道均显示目标蛋白在总裂解液中表达,而 IgG 对照泳道未见特异性条带,表明 EFhd2 与 ATG16L1 在体内存在特异性相互作用。见图 11。

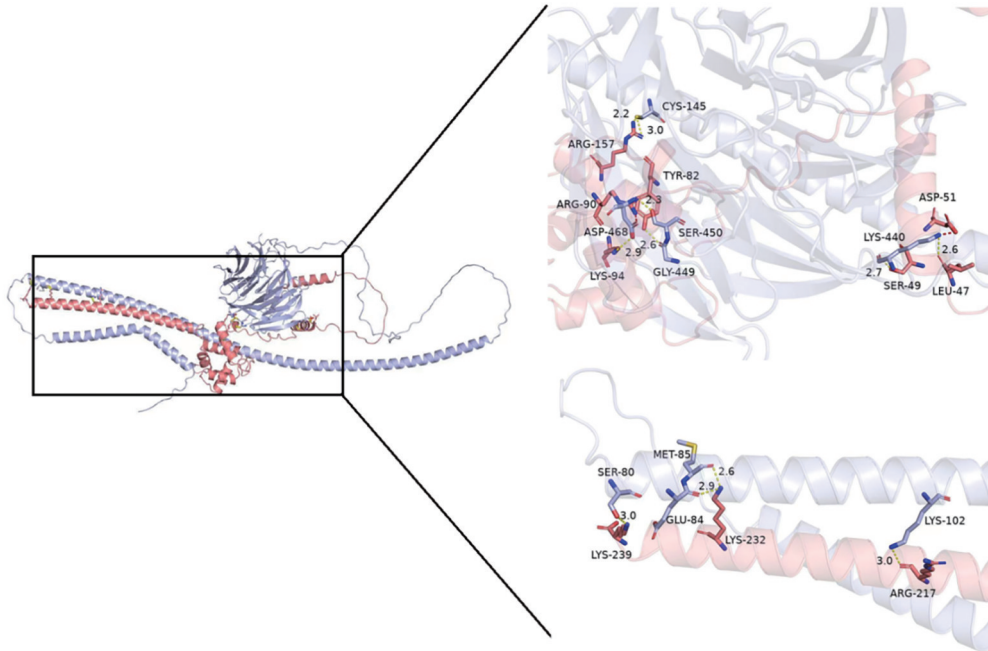


图 10 EFhd2 与 ATG16L1 作用位点预测

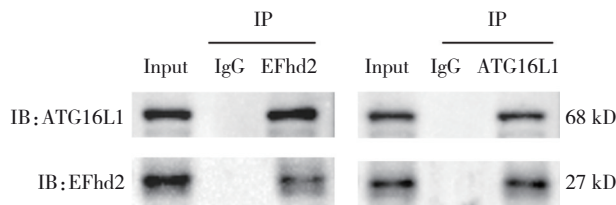
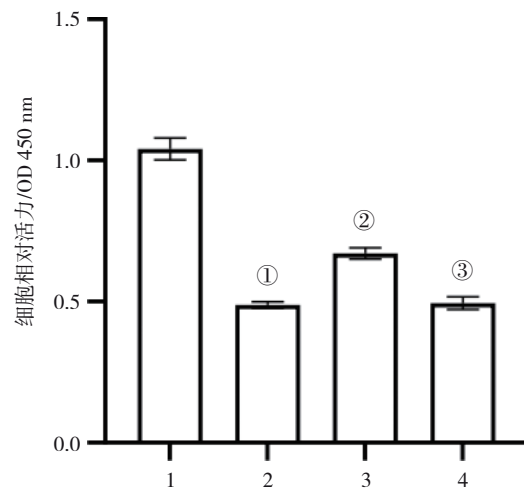


图 11 CO-IP 结果图

2.9 Peretinoin 对二乙酰吗啡干预后神经元细胞自噬水平的影响

使用 ATG16L1 激活剂 Peretinoin 作用 shEFhd2 组细胞 24 h 后, 给予二乙酰吗啡干预, 通过 CCK-8 实验检测细胞吸光度, 结果显示, 空载病毒对照组、DA 组、shEFhd2+DA 组、shEFhd2+Peretinoin+DA 组细胞吸光度分别为 (1.053 ± 0.040) 、 (0.491 ± 0.009) 、 (0.714 ± 0.019) 、 (0.499 ± 0.016) , 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=106.100, P=0.000$); DA 组细胞吸光度低于空载病毒对照组, shEFhd2+DA 组细胞吸光度高于 DA 组, shEFhd2+Peretinoin+DA 组细胞吸光度低于 shEFhd2+DA 组 ($P<0.05$), 见图 12。

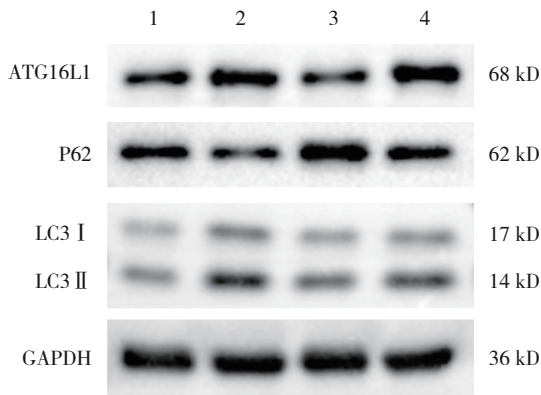
Western blotting 检测自噬蛋白结果显示, 空载病毒对照组、DA 组、shEFhd2+DA 组、shEFhd2+Peretinoin+DA 组细胞 ATG16L1、P62、LC3 II/I 蛋白相对表达量比较, 经方差分析, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$); DA 组 P62 蛋白相对表达量低于空载病



1: 空载病毒对照组; 2: DA 组; 3: shEFhd2+DA 组; 4: shEFhd2+Peretinoin+DA 组。①与空载病毒对照组比较, $P<0.05$; ②与 DA 组比较, $P<0.05$; ③与 shEFhd2+DA 组比较, $P<0.05$ 。

图 12 Peretinoin 对二乙酰吗啡干预后神经元细胞活力的影响

毒对照组, ATG16L1、LC3 II/I 蛋白相对表达量均高于空载病毒对照组; shEFhd2+DA 组细胞 P62 蛋白相对表达量高于 DA 组, ATG16L1、LC3 II/I 水平均低于 DA 组; shEFhd2+Peretinoin+DA 组 P62 蛋白相对表达量低于 shEFhd2+DA 组, ATG16L1、LC3 II/I 蛋白相对表达量均高于 shEFhd2+DA 组 ($P<0.05$)。见图 13 和表 4。



1: 空载病毒对照组; 2: DA 组; 3: shEFhd2+DA 组; 4: shEFhd2+Peretinoin+DA 组。

图 13 空载病毒对照组、DA 组、shEFhd2+DA 组、shEFhd2+Peretinoin+DA 组神经元细胞相关蛋白表达

表 4 空载病毒对照组、DA 组、shEFhd2+DA 组、shEFhd2+Peretinoin+DA 组神经元细胞相关蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	ATG16L1	LC3 II / I	P62
空载病毒对照组	0.94 ± 0.07	0.81 ± 0.05	1.08 ± 0.03
DA 组	1.22 ± 0.06 ^①	1.14 ± 0.06 ^①	0.92 ± 0.09 ^①
shEFhd2+DA 组	0.82 ± 0.01 ^②	0.93 ± 0.11 ^②	1.29 ± 0.06 ^②
shEFhd2+Peretinoin+DA 组	1.01 ± 0.18 ^③	1.42 ± 0.08 ^③	0.91 ± 0.11 ^③
F 值	7.182	48.560	13.570
P 值	0.000	0.000	0.000

注: ①与空载病毒对照组比较, $P < 0.05$; ②与 DA 组比较, $P < 0.05$; ③与 shEFhd2+DA 组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

本研究通过生物信息学方法对二乙酰吗啡成瘾大鼠和对照组大鼠的脑组织进行分析,通过对比发现二乙酰吗啡成瘾大鼠脑组织中的蛋白与对照组存在明显差异,对显著上调蛋白 EFhd2 的功能探索发现其与自噬密切相关,靶向自噬数据库提示 EFhd2 与自噬相关蛋白 ATG16L1 具有直接的调控关系,Alpha Fold3 互作预测显示 EFhd2 与 ATG16L1 存在潜在结合位点,故本研究推测两者可能参与二乙酰吗啡诱发的神经元自噬。动物水平复制二乙酰吗啡成瘾模型探索神经系统中自噬现象及 EFhd2 和 ATG16L1 表达改变;通过提取原代大鼠皮质神经元及给予不同浓度二乙酰吗啡干预建立神经元自噬模型,干预 EFhd2 后检测自噬水平变化,以及外源性恢复 ATG16L1 表达后的自噬水平改变,最终发现 EFhd2 和 ATG16L1 在二乙酰吗啡引起的神经元自噬

中发挥作用,并且现有的结果提示 EFhd2 可能通过调控 ATG16L1 表达水平,影响自噬体的形成,最终影响自噬过程。这一结果表明 EFhd2 和 ATG16L1 蛋白可能参与了由自噬介导的神经系统疾病,为临床预防和治疗神经系统疾病提供新的思路和靶点。

自噬是细胞内一种重要的生理过程,参与选择性清除受损细胞器的细胞稳态机制。生理状态下,自噬通过清除受损线粒体(线粒体自噬)、错误折叠蛋白(如 Tau 蛋白、 α -突触核蛋白)维持神经元稳态,在脑缺血、轻度氧化应激等场景中可减轻神经元损伤。研究表明,低剂量二乙酰吗啡可能通过激活 SH-SY5Y 细胞中的自噬来减轻 6-OHDA 诱导的内质网应激,恢复线粒体膜电位,并抑制 SH-SY5Y 细胞中细胞内活性氧的积累^[18];在二乙酰吗啡暴露情况下,细胞内正常的自噬水平被打破,从而发挥损伤效应。高浓度二乙酰吗啡作用可使培养的大鼠原代海马神经元发生变性、坏死和凋亡^[19],并且能过度升高人神经母细胞瘤细胞系 SH-SY5Y 细胞及大鼠海马中 Beclin1 和 ATG5 依赖的自噬^[20]。本研究在体外细胞水平观察到,二乙酰吗啡干预后 DA 组相较于对照组细胞活力显著降低,自噬蛋白水平明显升高,结果提示二乙酰吗啡可能通过提高自噬水平,诱导神经元损伤,该结果与过度自噬的损伤效应相一致。

EFhd2 作为钙信号调节蛋白,在生理状态下参与突触形成与成熟,通过维持神经细胞内运输保护神经元功能,在多种神经精神疾病^[21-24]模型中,EFhd2 的适度表达能够有效抑制病理性蛋白的异常聚集,从而发挥神经保护作用。该因子被发现在小胶质细胞中表达升高,其可能在小胶质细胞激活和神经炎症发展中发挥作用^[25],在小鼠体内 EFhd2 可参与形成细胞骨架成分^[26],在神经系统中的主要作用为参与神经细胞内运输^[27]。EFhd2 是突触的形成和成熟所必需的^[28],还可通过影响神经突触发育以外的方式参与控制突触的发育和维持^[29]。通过对 EFhd2 在神经系统中的功能探索发现 EFhd2 在细胞自噬的调控中起到关键作用,可能通过协助自噬体的形成或与自噬相关蛋白的相互作用来影响自噬过程^[30],这对于控制细胞内环境和清除损伤的细胞器至关重要。而当细胞内自噬平衡被打破时,EFhd2 即可发挥促损伤作用。本研究观察到二乙酰

吗啡干预的模型组中, EFhd2 表达水平明显升高, 与过度升高的自噬同趋势变化。但在对 EFhd2 敲降之后, 与 DA 组相比, shEFHD2+DA 组的细胞活力明显升高, 并且自噬蛋白的表达水平向基础水平恢复, 该结果为 EFhd2 促进二乙酰吗啡致神经元自噬过程提供了依据, 与先前学者在其他疾病模型中观察到的现象相契合。

ATG16L1 作为自噬小体形成的关键因子, 生理状态下通过介导自噬清除胞内废物, 在炎症反应中可限制过度免疫激活, 其功能缺失或编码区突变可导致自噬障碍, 从而在散发性帕金森病的发病及病理蛋白聚集中起促进作用^[31]; 在阿尔茨海默病模型的原代小鼠皮层神经元中观察到 ATG16L1 的表达水平异常升高^[32], 提示 ATG16L1 同样具有双重效应。本研究结果显示, 在二乙酰吗啡成瘾的大鼠模型以及细胞的自噬模型中, ATG16L1 蛋白表达水平相较于对照组均显著升高, 提示 ATG16L1 参与了二乙酰吗啡致神经元自噬并且发挥重要作用。EFhd2 敲低后逆转了二乙酰吗啡对神经元的损伤和自噬水平的升高, 外源性激活 ATG16L1 可抵消 EFhd2 敲低带来的保护作用, 提示 ATG16L1 可能作为 EFhd2 下游蛋白受其调控从而影响自噬过程。

本研究初步确定了在二乙酰吗啡致神经元损伤的特定场景下, EFhd2 与 ATG16L1 通过相互作用促进自噬过度激活, 最终加剧神经元损伤; 干预 EFhd2 表达可通过下调 ATG16L1 介导的自噬通量, 减轻二乙酰吗啡的神经毒性。但 EFhd2 参与了哪些自噬途径, 以及 EFhd2 和 ATG16L1 之间具体的调控机制尚不明确, 仍需进一步的探索。

参 考 文 献 :

[1] 中国国家禁毒委员会办公室. 2024年中国毒情形势报告[N]. 中国禁毒报, 2025-6-27(003).

[2] TIAN X, RU Q, XIONG Q, et al. Neurotoxicity induced by methamphetamine-heroin combination in PC12 cells[J]. *Neurosci Lett*, 2017, 647: 1-7.

[3] ZHU S S, SU L P, ZHUANG M J, et al. NEFL modulates NRN1-mediated mitochondrial pathway to promote diacetylmorphine-induced neuronal apoptosis[J]. *Mol Neurobiol*, 2025, 62(6): 6983-6997.

[4] 邱刚, 房保栓, 李永杰, 等. 吗啡暴露对猫行为敏化与神经元凋亡的影响[J]. *现代中西医结合杂志*, 2021, 30(22): 2414-2417.

[5] ATICI S, CINEL L, CINEL I, et al. Opioid neurotoxicity: comparison of morphine and tramadol in an experimental rat

model[J]. *Int J Neurosci*, 2004, 114(8): 1001-1011.

[6] CUNHA-OLIVEIRA T, REGO A, GARRIDO J, et al. Street heroin induces mitochondrial dysfunction and apoptosis in rat cortical neurons[J]. *J Neurochem*, 2007, 101(2): 543-554.

[7] 周燕, 叶峻, 韦献良, 等. 海洛因成瘾复吸大鼠中脑腹侧被盖区、伏隔核神经元超微结构和全脑多巴胺递质含量变化的研究[J]. *广西医科大学学报*, 2005, (2): 185-188.

[8] CECELI A O, HUANG Y F, KRONBERG G, et al. Common and distinct fronto-striatal volumetric changes in heroin and cocaine use disorders[J]. *Brain*, 2023, 146(4): 1662-1671.

[9] FUJIOKA Y, NODA N N. Biomolecular condensates in autophagy regulation[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2021, 69: 23-29.

[10] DERETIC V. Autophagy in inflammation, infection, and immunometabolism[J]. *Immunity*, 2021, 54(3): 437-453.

[11] KOGIAS G, KORNHUBER J, REIMER D, et al. Swiprosin-1/EFhd2: from immune regulator to personality and brain disorders[J]. *Neurosignals*, 2019, 27(S1): 1-19.

[12] SOLIMAN A S, UMSTEAD A, GRABINSKI T, et al. EFhd2 brain interactome reveals its association with different cellular and molecular processes[J]. *J Neurochem*, 2021, 159(6): 992-1007.

[13] BRONIARCZYK-CZARNIAK M, GAECKI P. Is the EFHD2/Swiprosin-1 protein linked to Alzheimer's disease? [J]. *Postepy Psychiatrii i Neurologii*, 2019, 28(3): 220-224.

[14] 高萌. *EFHD2* 基因座表达的调控序列及相关 SNPs 与精神分裂症的关联及法医学意义[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2021: 1-72.

[15] LI Y, ZHOU D M, REN Y H, et al. miR223 restrains autophagy and promotes CNS inflammation by targeting ATG16L1[J]. *Autophagy*, 2019, 15(3): 478-492.

[16] ZHOU Y, LERI F, HO A, et al. Suppression of hypothalamic-pituitary-adrenal axis by acute heroin challenge in rats during acute and chronic withdrawal from chronic heroin administration[J]. *Neurochem Res*, 2013, 38(9): 1850-1860.

[17] 苏丽萍, 路子扬, 刘丽, 等. 二乙酰吗啡致大鼠小脑颗粒神经元细胞凋亡过程中 C-Jun、CytC 和 Caspase-9 的作用[J]. *中国组织工程研究*, 2021, 25(25): 3943-3948.

[18] WANG B, SU C J, LIU T T, et al. The neuroprotection of low-dose morphine in cellular and animal models of Parkinson's disease through ameliorating endoplasmic reticulum (ER) stress and activating autophagy[J]. *Frontiers in molecular neuroscience*, 2018, 11: 120.

[19] 刘洋. 慢性吗啡作用诱导大鼠原代海马神经元损伤及其机制研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2016: 1-72.

[20] ZHAO L, ZHU Y, WANG D, et al. Morphine induces Beclin 1- and ATG5-dependent autophagy in human neuroblastoma SH-SY5Y cells and in the rat hippocampus[J]. *Autophagy*, 2010, 6(3): 386-394.

[21] YE H, ROBAK L A, YU M G, et al. Genetics and pathogenesis of Parkinson's syndrome[J]. *Annu Rev Pathol*, 2023, 18: 95-121.

- [22] VEGA I E, SUTTER A, PARKS L, et al. Tau's three-repeat domain and EFhd2 co-incubation leads to increased thioflavin signal[J]. *Front Neurosci*, 2018, 12: 879.
- [23] KOGIAS G, ZHENG F, KALINICHENKO L S, et al. Swiprosin1/EFhd2 is involved in the monoaminergic and locomotor responses of psychostimulant drugs[J]. *J Neurochem*, 2020, 154(4): 424-440.
- [24] MIELENZ D, REICHEL M, JIA T, et al. EFhd2/Swiprosin-1 is a common genetic determinant for sensation-seeking/low anxiety and alcohol addiction[J]. *Molecular Psychiatry*, 2018, 23(5): 1303-1319.
- [25] 谢非, 李晓恒, 程金波, 等. EFhd1/2 在 AD 患者及模型小鼠中的表达对比研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2022, 57(10): 1529-1535.
- [26] HUH Y H, KIM S H, CHUNG K H, et al. Swiprosin-1 modulates actin dynamics by regulating the F-actin accessibility to cofilin[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2013, 70: 4841-4854.
- [27] PUROHIT P, PEREZ-BRANGULI F, PROTS I, et al. The Ca^{2+} sensor protein swiprosin-1/EFhd2 is present in neurites and involved in kinesin-mediated transport in neurons[J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): e103976.
- [28] VEGA I E. EFhd2, a protein linked to Alzheimer's disease and other neurological disorders[J]. *Front Neurosci*. 2016, 10: 150.
- [29] BORGER E, HERRMANN A, MANN D A, et al. The calcium-binding protein EFhd2 modulates synapse formation *in vitro* and is linked to human dementia[J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2014, 73(12): 1166-1182.
- [30] OUGHTRED R, STARK C, BREITKREUTZ B J, et al. The BioGRID interaction database: 2019 update[J]. *Nucleic acids research*, 2019, 47(D1): 529-541.
- [31] GÓMEZ-MARTÍN A, FUENTES J M, JORDÁN J, et al. Comparative genetic analysis of the promoters of the *ATG16L1* and *ATG5* genes associated with sporadic Parkinson's disease[J]. *Genes (Basel)*, 2023, 14(12): 2171.
- [32] VIANELLO C, SALLUZZO M, ANNI D, et al. Increased expression of autophagy-related genes in Alzheimer's disease-type 2 diabetes mellitus comorbidity models in cells[J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2023, 20(5): 4540.

(张蕾 编辑)

本文引用格式: 戴晨璐, 刘静宇, 苏丽萍, 等. EFhd2 和 ATG16L1 在二乙酰吗啡致神经元自噬中的作用研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2026, 36(11): 31-42.

Cite this article as: DAI C L, LIU J Y, SU L P, et al. Study on the role of EFhd2 and ATG16L1 in neuronal autophagy induced by diacetylmorphine[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2026, 36(11): 31-42.