

$\alpha 5$ -nAChR 对慢性应激肺腺癌荷瘤小鼠疑核 c-Fos 表达的影响

蔡佳莹¹,王靖婷¹,王增萍²,王璟¹,郝雁飞¹,马晓丽^{1,2}

(1.山东第一医科大学附属中心医院基础医学研究中心,山东 济南 250013;

2.山东第二医科大学医学检验学院,山东 潍坊 261053)

摘要:目的 探讨 $\alpha 5$ -烟碱型乙酰胆碱受体($\alpha 5$ -nicotinic acetylcholine receptor, $\alpha 5$ -nAChR)对慢性不可预见性应激(chronic unpredictable mild stress, CUMS)肺腺癌荷瘤小鼠疑核 c-Fos 表达的影响。方法 运用免疫组织化学技术检测 NC+CUMS 组($n=6$)、CUMS+CHRNA5^{+/+}组($n=6$)及 CUMS+CHRNA5^{+/+}+Mec 组($n=6$)肺腺癌荷瘤小鼠组织中 $\alpha 5$ -nAChR 与 Ki67 的表达及相关性;运用免疫荧光技术检测 NC 组($n=6$)、NC+CUMS 组($n=6$)、CUMS+CHRNA5^{+/+}组($n=6$)及 CUMS+CHRNA5^{+/+}+Mec 组($n=6$)肺腺癌荷瘤小鼠疑核 c-Fos 的表达。结果 $\alpha 5$ -nAChR 与 Ki67 的表达呈正相关($P<0.05$), $\alpha 5$ -nAChR 介导慢性应激促进肺腺癌细胞增殖; $\alpha 5$ -nAChR 表达与疑核 c-Fos 的表达呈正相关($P<0.05$)。结论 $\alpha 5$ -nAChR 调控慢性应激肺腺癌荷瘤小鼠疑核 c-Fos 的表达。

关键词: $\alpha 5$ -烟碱型乙酰胆碱受体;c-Fos;疑核;慢性应激;肺腺癌;小鼠

中图分类号:R734.2

文献标志码:A

Effect of $\alpha 5$ -nAChR on the expression of c-Fos in nucleus ambiguus in chronic stress-induced lung adenocarcinoma mice

CAI Jiaying¹, WANG Jingting¹, WANG Zengping², WANG Jing¹, JIA Yanfei¹, MA Xiaoli^{1,2}

(1. Research Center of Basic Medicine, Central Hospital Affiliated to Shandong First Medical University, Jinan 250013,

Shandong, China; 2. Department of Medical Laboratory, Shandong Second Medical University,

Weifang 261053, Shandong, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of $\alpha 5$ -nicotinic acetylcholine receptor ($\alpha 5$ -nAChR) on the expression of c-Fos in nucleus ambiguus in chronic unpredictable mild stress (CUMS)-induced lung adenocarcinoma mice.

Methods The expression and correlation between $\alpha 5$ -nAChR and Ki67 in tumour tissues of the NC+CUMS group ($n=6$), the CUMS+CHRNA5^{+/+} group ($n=6$) and the CUMS+CHRNA5^{+/+}+Mec group ($n=6$) were examined using immunohistochemistry in lung adenocarcinoma mice. Immunofluorescence technique was used to detect the expression of c-Fos in nucleus ambiguus of the NC group ($n=6$), the NC+CUMS group ($n=6$), the CUMS+CHRNA5^{+/+} group and the CUMS+CHRNA5^{+/+}+Mec group ($n=6$) in lung adenocarcinoma mice. **Results** $\alpha 5$ -nAChR was positively correlated with the expression of Ki67 ($P<0.05$) and $\alpha 5$ -nAChR mediates chronic stress-induced lung adenocarcinoma cell proliferation. $\alpha 5$ -nAChR expression was positively correlated with the expression of c-Fos in nucleus ambiguus ($P<0.05$).

Conclusion $\alpha 5$ -nAChR mediates the expression of c-Fos in nucleus ambiguus in chronic stress-induced lung adenocarcinoma mice.

Key words: $\alpha 5$ -nicotinic acetylcholine receptor; c-Fos; Nucleus ambiguus; Chronic stress; Lung adenocarcinoma; Mice

肺癌在我国各种恶性肿瘤中发病率和死亡率均排名第一^[1]。肺腺癌是最常见的肺癌类型,约占所有肺癌类型的一半,且患者就诊时大多处于中晚期。肺腺癌的早发现、早诊断、早治疗对于改善患者的预后具有重要意义。慢性应激影响肿瘤增殖,与肿瘤发病率、特异性死亡率增加显著相关,促进肿瘤的发生发展^[2-3]。全基因组关联分析研究表明,烟碱型乙酰胆碱受体(nicotinic acetylcholine receptor, nAChR)基因簇 *CHRNA5/A3/B4* 的变异与肺癌密切相关,其中编码 $\alpha 5$ -nAChR 的 *CHRNA5* 基因变异与肺癌发生尤为相关,可能是肺癌发生的候选基因^[4]。本课题组前期研究已表明, $\alpha 5$ -nAChR 过表达促进慢性应激介导的肺腺癌的发生发展^[5],Ki67 已被用作恶性肿瘤细胞增殖的标志物,与肿瘤细胞增殖密切相关。

既往研究发现,慢性应激通过刺激交感神经和副交感神经系统促进肿瘤进展^[6-10]。疑核是特殊内脏运动核,位于延髓被盖部的网状结构中,是长棒状的核团,自延髓脑桥分界处起,下达锥体交叉平面,其发出纤维可进入脑神经。研究发现,副交感神经纤维在肺腺癌组织中分布广泛,其主要由疑核发出的迷走神经肺支构成,释放乙酰胆碱支配肺组织^[11]。但 $\alpha 5$ -nAChR 对慢性应激肺腺癌荷瘤小鼠疑核神经元活性的影响尚不明确。

c-Fos 被用作神经元活动的标志物,与许多受刺激影响的神经元以及行为反应有关^[12-13]。c-Fos 是一种核磷蛋白,与 c-Jun 形成异二聚体,在细胞发育、信号转导,细胞增殖和分化中具有重要作用,参与细胞外刺激后的细胞增殖和分化,其失调与癌症进程相关^[14-15]。生长因子、细胞因子、神经递质、多肽激素和应激等多种细胞外刺激,可诱导 c-Fos 的表达。作为即刻早期基因(immediate early genes, IEGs)中最有特征、最重要的基因之一,c-Fos 在接受刺激后即刻表达,寿命很短,几个小时后蛋白水平消失^[16]。研究表明,束缚-浸水应激(restraint water-immersion stress, RWIS)导致胃机能紊乱过程中,疑核 c-Fos 的表达升高^[17]。

本文通过免疫组织化学染色、免疫荧光染色等实验方法,初步探讨 $\alpha 5$ -nAChR 对慢性应激肺腺癌荷瘤小鼠疑核 c-Fos 表达的影响,为探讨疑核- $\alpha 5$ -nAChR 脑肺轴介导慢性应激促肺腺癌进展的神经调控机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 裸鼠组织标本及来源

裸鼠肺腺癌异种移植组织切片来源于本课题组前期样本^[5]。所有动物实验均获得济南市中心医院伦理委员会许可(JNCHIACUC2021-77)。

1.1.2 主要试剂

CHRNA5 过表达慢病毒转染试剂购自上海吉凯基因科技有限公司;兔二步法检测试剂盒(PV9001)、鼠二步法检测试剂盒(PV9002)、DAB 显色试剂盒(ZLI-9018)购自北京中杉金桥生物科技有限公司;兔抗人 $\alpha 5$ -nAChR 多克隆抗体(Cat no. bs-19240R)购自北京博奥森生物技术有限公司;鼠抗人 Ki67 单克隆抗体(Cat no. sc-23900)购自美国 SANTA CRUZ 生物有限公司;兔抗人 c-Fos 多克隆抗体(Cat no. ab190289)购自英国 Abcam 公司。 $\alpha 5$ -nAChR 抑制剂美加明(mecamylamine, Mec)(HY-B1395)购自美国 MCE 生物科技公司。

1.2 方法

1.2.1 慢性不可预见性应激(chronic unpredictable mild stress, CUMS)模型的建立

通过皮下与尾静脉注射肺癌细胞 A549 细胞构建裸鼠荷瘤模型,建立 CUMS 模型:连续 28 d 暴露于不可预测的温和应激中,每天随机两种不同的应激方式,主要包括昼夜颠倒、冷/热水浴 5 min、倾斜笼 45°、潮湿垫料、电击鼠尾、捆绑 2 h、禁食禁水等。实验分为对照组(NC 组)、慢性应激对照组(NC+CUMS 组)、慢性应激联合 *CHRNA5* 过表达组(CUMS+*CHRNA5*^{+/+}组)、慢性应激联合 *CHRNA5* 过表达抑制剂组(CUMS+*CHRNA5*^{+/+}+Mec 组),每组 6 只,饲养 4 周后处死,收集裸鼠的肺腺癌组织及脑组织,包埋、切片处理。

1.2.2 免疫组织化学技术

将裸鼠肺腺癌异种移植组织切片置于 60 °C 烤片机 2 h。脱蜡液 I 和脱蜡液 II 液中分别浸泡 20 min 和 15 min。脱蜡后,将切片依次浸入系列乙醇(100%、95%、75%)复水,每梯度 5 min。 $\alpha 5$ -nAChR 和 Ki67 分别在柠檬酸盐抗原修复液和 EDTA 抗原修复液中修复抗原。室温冷却后,用 PBS 缓冲液洗 3 次,每次 3 min。将阻断剂滴在组织切片上,室温下孵育 15 min,清洗。滴加封闭液,置于湿盒中室温孵育 20 min。滴加配好的一抗稀释液(抗体稀释比例: $\alpha 5$ -nAChR 为 1:200, Ki67 为 1:200)4 °C 孵育过夜,

清洗。滴加相应二抗,室温孵育15 min,清洗。DAB 避光显色;苏木素行细胞核染色。系列乙醇中浸泡 5 min,二甲苯溶液中洗净。中性树脂封片。数字病理切片扫描仪进行扫描,400 倍视野下随机选取不少于 5 个视野拍照。行人工半定量评分以及 Image J 软件定量评分。

1.2.3 免疫荧光技术

将肺腺癌异种移植裸鼠脑组织切片用 PBS 缓冲液洗 3 次,每次 10 min。0.3%的 PBST 清洗 1 h, PBS 清洗。用含 5% BSA 的封闭液室温封闭 2 h。滴加配好的一抗稀释液(抗体稀释比例:c-Fos 为 1:500)4 ℃ 孵育过夜, PBS 清洗。滴加相应二抗避光室温孵育 2 h, PBS 清洗。滴加 DAPI 避光室温孵育 10 min, PBS 清洗。滴加防淬灭剂并封片。数字病理切面扫描仪进行明场扫描。行人工半定量评分以及 Image J 软件定量评分。

1.3 统计学处理

使用 GraphPad Prism 8.0、SPSS 27.0 对所有数据进行统计分析。数据采用双尾单样本 t 检验、单因素方差分析和 Dunnett- t 检验。 $\alpha 5$ -nAChR、Ki67 表达相关性分析采用 Pearson 卡方检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 $\alpha 5$ -nAChR 介导慢性应激促肺腺癌细胞增殖

裸鼠肺腺癌异种植物组织切片的免疫组织化学染色结果显示, $\alpha 5$ -nAChR、Ki67 在 CUMS+CHRNA5^{+/+}组中表达水平高于 NC+CUMS 组,在 CUMS+CHRNA5^{+/+}+Mec 组中的表达水平低于 CUMS+CHRNA5^{+/+}组(P 均 < 0.05)。根据免疫组织化学染色得分绘制散点图得知, $\alpha 5$ -nAChR 与 Ki67 的表达为直线正相关($r = 0.97, P < 0.05$)。见图 1。

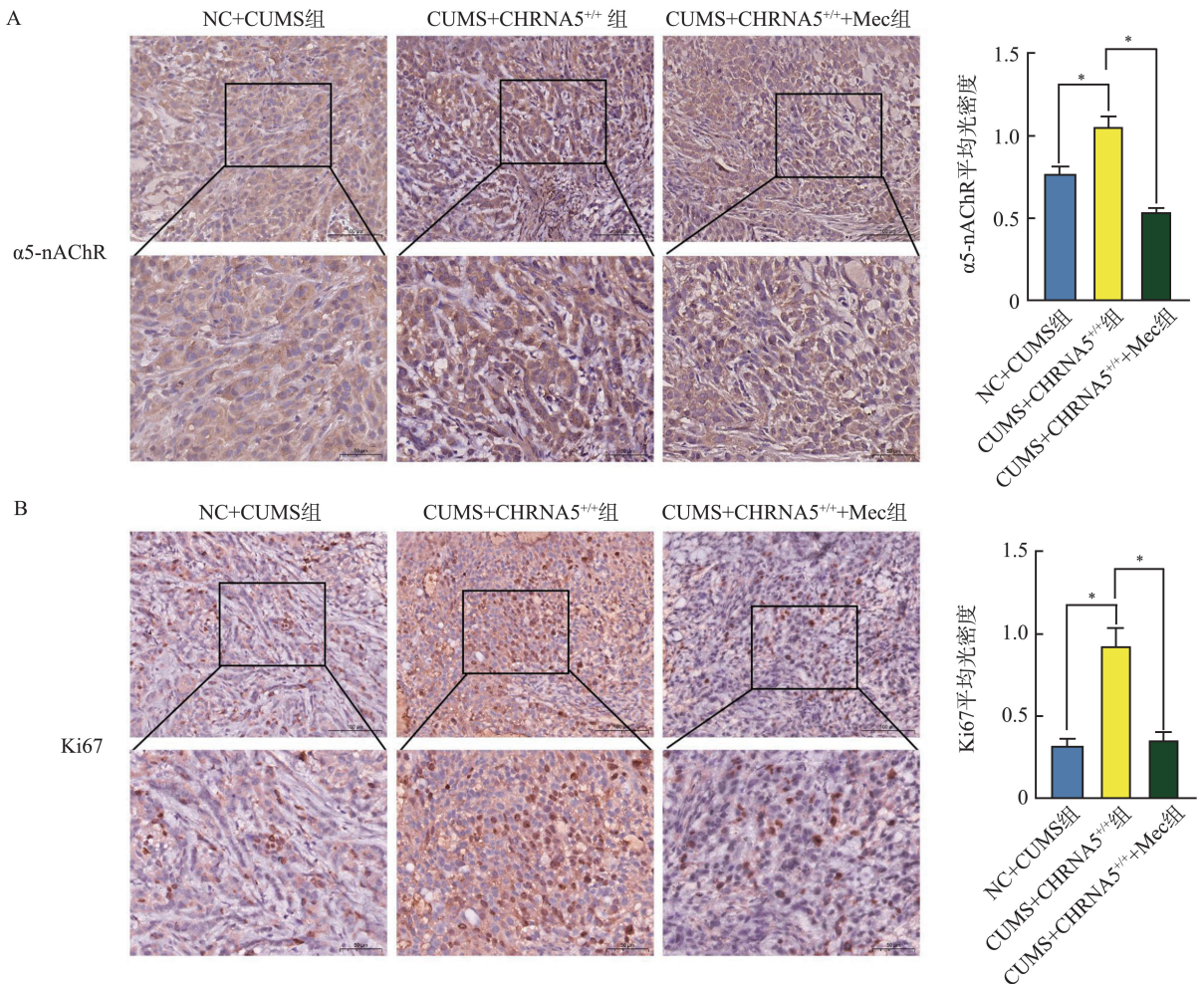


图 1 $\alpha 5$ -nAChR 和 Ki67 在裸鼠肺腺癌组织中的表达(免疫组织化学染色, $\times 400$), * $P < 0.05$

A: $\alpha 5$ -nAChR 在癌组织中的表达; B: Ki67 在癌组织中的表达。

Figure 1 $\alpha 5$ -nAChR and Ki67 expressions in LUAD tumour exograft tissues of nude mice (immunohistochemical staining, $\times 400$), * $P < 0.05$

A: $\alpha 5$ -nAChR expression in cancer tissues; B: Ki67 expression in cancer tissues.

2.2 慢性应激荷瘤小鼠疑核 c-Fos 的表达

肺腺癌荷瘤小鼠脑组织切片的免疫荧光染色结

果显示,疑核 c-Fos 在 NC+CUMS 组中的表达水平高于 NC 组($P<0.05$)。见图 2。

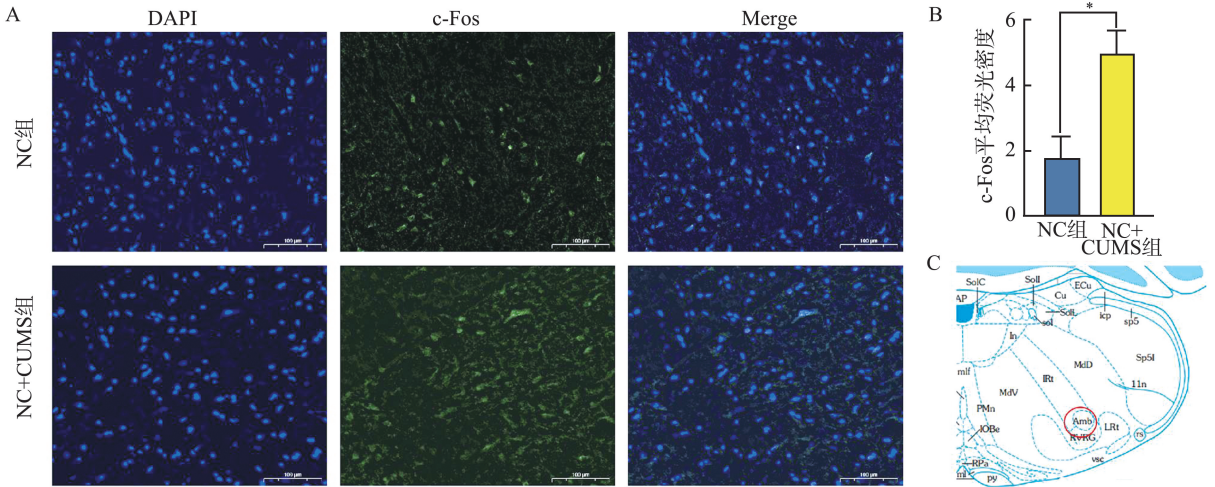


图 2 疑核 c-Fos 在慢性应激肺腺癌荷瘤小鼠脑组织中的表达

A: c-Fos 的表达(免疫荧光染色, $\times 400$); B: c-Fos 表达的量化($*t=5.65, P<0.05$); C: 疑核在小鼠脑图谱的核团定位。

Figure 2 Expression of c-Fos in nucleus ambiguus of chronic stress-induced lung adenocarcinoma in mice

A: c-Fos expression (immunofluorescence staining, $\times 400$); B: Quantification of c-Fos expression ($*t=5.65, P<0.05$); C: Localization of the nucleus ambiguus in the mouse brain atlas.

2.3 $\alpha 5$ -nAChR 对肺腺癌荷瘤小鼠疑核 c-Fos 表达的影响

肺腺癌荷瘤小鼠脑组织切片的免疫荧光染色结果显示,在慢性应激下,疑核 c-Fos 在 CUMS+CHR-

NA5^{+/+}组中表达水平高于 NC+CUMS 组,在 CUMS+CHRNA5^{+/+}+Mec 组中的表达水平低于 CUMS+CHRNA5^{+/+}组(P 均 <0.05),表明 $\alpha 5$ -nAChR 影响肺腺癌荷瘤小鼠疑核 c-Fos 的表达。见图 3。

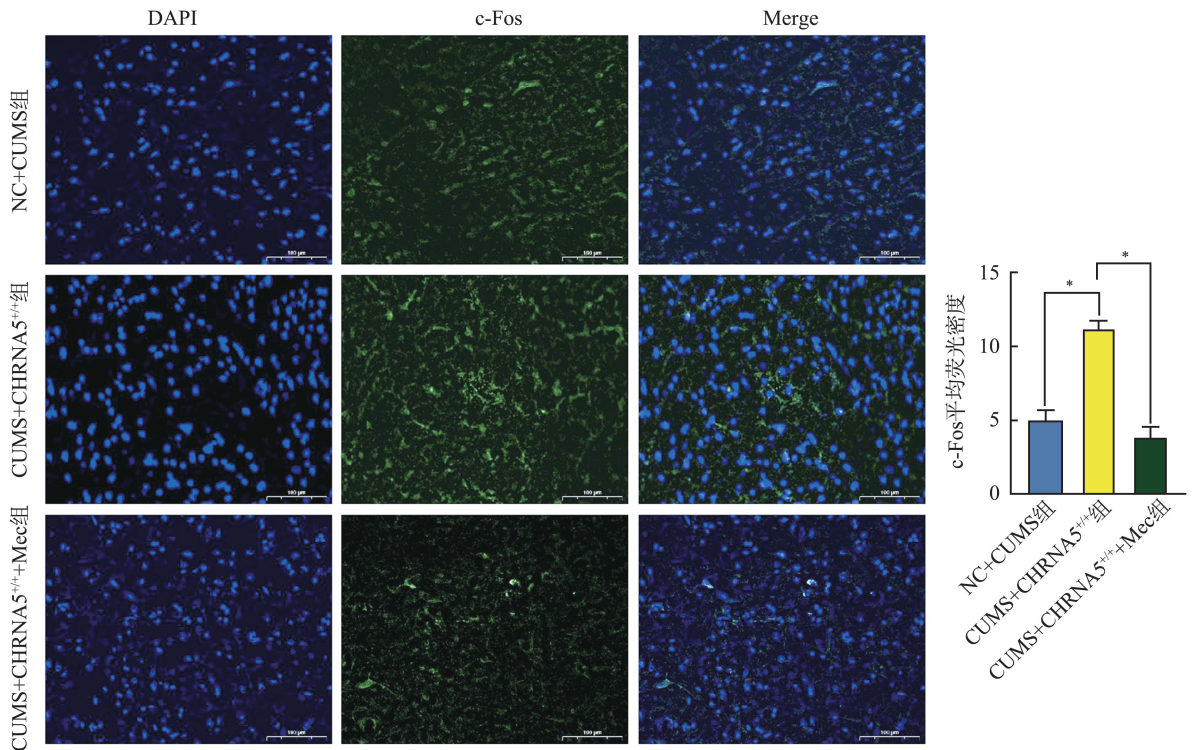


图 3 $\alpha 5$ -nAChR 对肺腺癌荷瘤小鼠疑核 c-Fos 表达的影响(免疫荧光染色, $\times 400$), $*P<0.05$

Figure 3 The effect of $\alpha 5$ -nAChR on the expression of c-Fos in nucleus ambiguus in lung adenocarcinoma mice (immunofluorescence staining, $\times 400$), $*P<0.05$

3 讨论

慢性应激可诱发肿瘤的发生并促进肿瘤的进展^[18-19]。本课题组前期报道,慢性应激增加神经递质乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)和 $\alpha 5$ -nAChR 的表达,通过 ACh/ $\alpha 5$ -nAChR 轴促进肺腺癌的增殖、侵袭和转移^[5,20],且 $\alpha 5$ -nAChR 激活多种下游信号途径以及与免疫相关炎症因子,促进肺腺癌的增殖、迁移、侵袭和免疫逃逸^[21-27]。研究表明,在束缚应激促胃溃疡过程下,疑核 c-Fos 的表达升高^[17]。本研究发现, $\alpha 5$ -nAChR 的表达影响慢性应激肺腺癌荷瘤小鼠疑核 c-Fos 的表达,提示疑核与 $\alpha 5$ -nAChR 在慢性应激促肺腺癌进展中存在相关性。

乙酰胆碱可通过 nAChRs 参与不同类型肿瘤(肺癌、胃癌、乳腺癌等)的细胞增殖、凋亡及侵袭转移等^[28]。nAChRs 是由五个跨膜单元组成的五聚体结构,通常在神经肌肉连接处和神经细胞上表达,以配体门控离子通道发挥作用^[29]。nAChRs 由多种亚单位($\alpha 2 \sim \alpha 10, \beta 2 \sim \beta 4$)组成,以异聚体或同聚体的形式排列^[30]。nAChRs 的不同亚基与多种癌症的发生发展密切相关^[31]。 $\alpha 7$ -nAChR 和 $\alpha 9$ -nAChR 在促进肺癌细胞生长中发挥作用^[32]; $\alpha 9$ -nAChR 在三阴性乳腺癌中大量表达,并作为靶向配体,在治疗方面发挥潜力^[33]。 $\alpha 5$ -nAChR 在肺腺癌增殖、侵袭转移及免疫逃逸中发挥重要作用。

慢性应激是指在生理及心理等应激源刺激下引发的非特异性适应性反应,主要表现为焦虑抑郁情绪,已成为当代社会个体的共同特征。慢性应激还会诱发一系列癌症风险,可影响肿瘤的发生发展、预后及肿瘤微环境组成^[18-19]。越来越多的证据表明,慢性应激与肿瘤的发生有关,慢性应激促进肿瘤的侵袭、转移和进展。研究表明,慢性应激通过丘脑-垂体-肾上腺轴、交感神经系统、副交感神经系统、微生物-肠道-大脑轴等途径进行调控,与癌症发生发展密切相关^[8, 34]。本课题组前期研究发现,慢性应激通过神经递质 ACh 结合 $\alpha 5$ -nAChR 促肺腺癌进展。在此基础上,本研究阐明 $\alpha 5$ -nAChR 对慢性应激肺腺癌荷瘤小鼠疑核 c-Fos 表达的影响,提示疑核- $\alpha 5$ -nAChR 脑肺轴可能介导慢性应激促肺腺癌进展,为防治肺腺癌提供新思路。

参考文献:

[1] Thai AA, Solomon BJ, Sequist LV, et al. Lung cancer [J]. *Lancet*, 2021, 398(10299): 535-554.

[2] Wang YH, Li JQ, Shi JF, et al. Depression and anxiety in relation to cancer incidence and mortality: a systematic review and meta-analysis of cohort studies [J]. *Mol Psychiatry*, 2020, 25(7): 1487-1499.

[3] Bai L, Huang C, Xu ZY, et al. Differences of healthcare utilization and cost between cancer inpatients with and without depression: based on national health insurance database [J]. *Psychooncology*, 2021, 30(6): 979-981.

[4] Chen LS, Hung RJ, Baker T, et al. CHRNA5 risk variant predicts delayed smoking cessation and earlier lung cancer diagnosis—a meta-analysis [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2015, 107(5): djv100. doi: 10.1093/jnci/djv100

[5] Jiao Y, Kang GY, Pan P, et al. Acetylcholine promotes chronic stress-induced lung adenocarcinoma progression via $\alpha 5$ -nAChR/FHIT pathway [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2023, 80(5): 119. doi: 10.1007/s00018-023-04742-7

[6] Tian WT, Liu Y, Cao CH, et al. Chronic stress: impacts on tumor microenvironment and implications for anti-cancer treatments [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 777018. doi: 10.3389/fcell.2021.777018

[7] Hong HQ, Ji M, Lai DM. Chronic stress effects on tumor: pathway and mechanism [J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 738252. doi: 10.3389/fonc.2021.738252

[8] Gui H, Chen XL, Li LZ, et al. Psychological distress influences lung cancer: advances and perspectives on the immune system and immunotherapy [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 121: 110251. doi: 10.1016/j.intimp.2023.110251

[9] Pan CQ, Wu JH, Zheng ST, et al. Depression accelerates gastric cancer invasion and metastasis by inducing a neuroendocrine phenotype via the catecholamine/ $\beta 2$ -AR/MACC1 axis [J]. *Cancer Commun*, 2021, 41(10): 1049-1070.

[10] Pan J, Zhang LY, Wang XM, et al. Chronic stress induces pulmonary epithelial cells to produce acetylcholine that remodels lung pre-metastatic niche of breast cancer by enhancing NETosis [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2023, 42(1): 255. doi: 10.1186/s13046-023-02836-5

[11] Hutchings C, Phillips JA, Djamgoz MBA. Nerve input to tumours: pathophysiological consequences of a dynamic relationship [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2020, 1874(2): 188411. doi: 10.1016/j.bbcan.2020.188411

[12] Ma QH, Wonnacott S, Bailey SJ, et al. Sex differences in brain region-specific activation of c-Fos following kappa opioid receptor stimulation or acute stress in mice [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(20): 15098. doi: 10.3390/ijms242015098

[13] Aguilar-Delgado A, Cruz-Mendoza F, Luquin-de Andais Teh S, et al. Stress-induced c-fos expression in the medial prefrontal cortex differentially affects the main

- residing cell phenotypes[J]. *Heliyon*, 2024, 10(20): e39325. doi: 10.1016/j.heliyon.2024.e39325
- [14] Bakiri L, Hasenfuss SC, Guío-Carrión A, et al. Liver cancer development driven by the AP-1/c-Jun ~ Fra-2 dimer through c-Myc[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2024, 121(18): e2404188121. doi: 10.1073/pnas.2404188121
- [15] Kim E, Rahmawati L, Aziz N, et al. Protection of c-Fos from autophagic degradation by PRMT1-mediated methylation fosters gastric tumorigenesis[J]. *Int J Biol Sci*, 2023, 19(12): 3640-3660. doi: 10.7150/ijbs.85126
- [16] Fujita H, Fujita T, Fujii H. IL-3-induced immediate expression of c-fos and c-jun is modulated by the IKK2-JNK axis[J]. *Cells*, 2022, 11(9): 1451. doi: 10.3390/cells11091451
- [17] Wang ZP, Shen YY, Huang CX, et al. Astrocytes in the spinal cord contributed to acute stress-induced gastric damage via the gap junction protein CX43[J]. *Brain Res*, 2023, 1811: 148395. doi: 10.1016/j.brainres.2023.148395
- [18] He XY, Gao Y, Ng D, et al. Chronic stress increases metastasis via neutrophil-mediated changes to the microenvironment[J]. *Cancer Cell*, 2024, 42(3): 474-486.e12.
- [19] 刘明心, 谢雪梅, 李强, 等. 慢性应激与肿瘤的发生与演进[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2021, 52(1): 39-44. LIU Mingxin, XIE Xuemei, LI Qiang, et al. A review of chronic stress and the initiation and evolution of cancer[J]. *Journal of Sichuan University(Medical Science Edition)*, 2021, 52(1): 39-44.
- [20] Wang JT, Cai JY, Wang ZP, et al. $\alpha 5$ -nAChR/NETO2 contributed to chronic stress-promoted lung adenocarcinoma progression[J]. *Cancer Cell Int*, 2025, 25(1): 67. doi:10.1186/s12935-025-03701-5
- [21] Kang GY, Song H, Bo L, et al. Nicotine promotes M2 macrophage polarization through $\alpha 5$ -nAChR/SOX2/CSF-1 axis in lung adenocarcinoma[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2024, 74(1): 11. doi: 10.1007/s00262-024-03866-4
- [22] Li Q, Li JT, Wang JT, et al. PLEK2 mediates metastasis and invasion via $\alpha 5$ -nAChR activation in nicotine-induced lung adenocarcinoma[J]. *Mol Carcinog*, 2024, 63(2): 253-265.
- [23] Cai JY, Wang JT, Wang ZP, et al. Perspectives on the $\alpha 5$ nicotinic acetylcholine receptor in lung cancer progression[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2025, 13: 1489958. doi:10.3389/fcell.2025.1489958
- [24] Kang GY, Jiao Y, Pan P, et al. $\alpha 5$ -nAChR/STAT3/CD47 axis contributed to nicotine-related lung adenocarcinoma progression and immune escape[J]. *Carcinogenesis*, 2023, 44(10/11): 773-784.
- [25] Zhu P, Kang GY, Jiao Y, et al. The $\alpha 5$ -nAChR/PD-L1 axis facilitates lung adenocarcinoma cell migration and invasion[J]. *Hum Cell*, 2022, 35(4): 1207-1218.
- [26] Zhu P, Jin ZX, Kang GY, et al. Alpha5 nicotinic acetylcholine receptor mediated immune escape of lung adenocarcinoma via STAT3/Jab1-PD-L1 signalling[J]. *Cell Commun Signal*, 2022, 20(1): 121. doi: 10.1186/s12964-022-00934-z
- [27] 王靖婷, 王璟, 鲁艺, 等. $\alpha 5$ -nAChR 与 MHC-I 在肺腺癌中的表达及相关性[J]. *山东大学学报(医学版)*, 2024, 62(5): 72-78. WANG Jingting, WANG Jing, LU Yi, et al. The expression and correlation of $\alpha 5$ -nAChR and MHC-I in lung adenocarcinoma[J]. *Journal of Shandong University(Health Sciences)*, 2024, 62(5): 72-78.
- [28] Kato M, Kolotuev I, Cunha A, et al. Extrasynaptic acetylcholine signaling through a muscarinic receptor regulates cell migration[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118(1): e1904338118. doi: 10.1073/pnas.1904338118
- [29] Pechlivanidou M, Ninou E, Karagiorgou K, et al. Autoimmunity to neuronal nicotinic acetylcholine receptors[J]. *Pharmacol Res*, 2023, 192: 106790. doi: 10.1016/j.phrs.2023.106790
- [30] Mineur YS, Soares AR, Etherington IM, et al. Pathophysiology of nAChRs; limbic circuits and related disorders[J]. *Pharmacol Res*, 2023, 191: 106745. doi: 10.1016/j.phrs.2023.106745
- [31] He ZH, Xu YQ, Rao ZH, et al. The role of $\alpha 7$ -nAChR-mediated PI3K/AKT pathway in lung cancer induced by nicotine[J]. *Sci Total Environ*, 2024, 912: 169604. doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.169604
- [32] Giraudo A, Pallavicini M, Bolchi C. Small molecule ligands for $\alpha 9^*$ and $\alpha 7$ nicotinic receptors; a survey and an update, respectively[J]. *Pharmacol Res*, 2023, 193: 106801. doi:10.1016/j.phrs.2023.106801
- [33] Liao YC, Cheng TC, Tu SH, et al. Tumor targeting and therapeutic assessments of RNA nanoparticles carrying $\alpha 9$ -nAChR aptamer and anti-miR-21 in triple-negative breast cancers[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2023, 33: 351-366. doi:10.1016/j.omtn.2023.07.013
- [34] Ye L, Hou YL, Hu WY, et al. Repressed Blautia-acetate immunological axis underlies breast cancer progression promoted by chronic stress[J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 6160. doi:10.1038/s41467-023-41817-2