

本文引文格式:王亮亮,马珊珊,周黎,等.角鲨烯环氧化酶通过调控 AKT/mTOR 信号通路促进卵巢癌细胞的糖代谢[J].右江民族医学院学报,2023,45(4):570-576.

【论著与临床报道】

角鲨烯环氧化酶通过调控 AKT/mTOR 信号通路促进卵巢癌细胞的糖代谢

王亮亮,马珊珊,周黎,王丽华

(蚌埠医学院第一附属医院肿瘤妇科,安徽 蚌埠 233000)

摘要:目的 研究角鲨烯环氧化酶(squalene epoxidase, SQLE)在卵巢癌中的作用机制。方法 收集50例新鲜卵巢癌及癌旁正常组织,免疫组化检测两组 SQLE 表达差异。同时,蛋白印迹实验(Western Blot, WB)检测 SQLE 在卵巢癌细胞系中的表达情况。通过克隆形成实验及流式细胞仪实验检测对卵巢癌细胞增殖、凋亡的影响。通过 WB 研究 SQLE 对卵巢癌的作用机制。**结果** SQLE 在卵巢癌组织及癌细胞系中相比于正常组织或上皮细胞表达水平显著上升。克隆形成实验结果显示,敲减 SQLE 表达后,卵巢癌细胞增殖能力受到抑制。流式细胞仪实验结果显示,敲减 SQLE 表达后,促进了卵巢癌凋亡。WB 实验结果显示,在抑制 SQLE 表达后,沃伯格效应关键蛋白 GLUT1、LDH 表达显著下降,葡萄糖消耗水平、乳酸水平和 ATP 水平显著降低。对蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素靶点(protein kinase B/mammalian target of rapamycin, AKT/mTOR)信号通路关键蛋白检测,发现下调 SQLE 表达后,p-AKT、p-mTOR 蛋白水平明显下降。**结论** SQLE 在卵巢癌中高表达,并且可能通过 AKT/mTOR 信号通路促进卵巢癌细胞的糖代谢并且抑制细胞凋亡。

关键词:角鲨烯环氧化酶;卵巢肿瘤;蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素靶点信号通路;糖代谢

中图分类号:R737.31 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-5817(2023)04-0570-07

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2023.04.005

SQLE promotes glucose metabolism in ovarian cancer cells by regulating AKT/mTOR signaling pathway

Wang Liangliang, Ma Shanshan, Zhou Li, Wang Lihua

(Department of Oncology Gynecology, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233000, Anhui, China)

Abstract: **Objective** To investigate the mechanism of squalene epoxidase (SQLE) in ovarian cancer.

Methods 50 cases of fresh ovarian cancer and adjacent normal tissues were collected. Immunohistochemistry was used to detect SQLE expression difference between the two groups. Meanwhile, the expression of SQLE in ovarian cancer cell lines was detected by Western Blot (WB). The effects of SQLE on proliferation and apoptosis of ovarian cancer cells were investigated by clonal formation and flow cytometry. The mechanism of SQLE in ovarian cancer was studied by WB. **Results** The expression level of SQLE in ovarian cancer tissues and cancer cell lines was significantly higher than that in normal tissues or epithelial cells. The results of clone formation experiment showed that the proliferation ability of ovarian cancer cells was inhibited after knockout of the expression of SQLE. Flow cytometry showed that knockout of the expression of SQLE promoted the apoptosis of ovarian cancer. WB results showed that after inhibiting SQLE expression, the expression of Warburg

基金项目:安徽省教育厅高校自然科学重点项目(2022AH051502)

第一作者简介:王亮亮(1980-),男,硕士,副主任医师,研究方向:妇科肿瘤,E-mail: mengbo1980@163.com

通讯作者简介:王丽华(1976-),女,硕士,主任医师,研究方向:妇科肿瘤,E-mail: doctorwlh@163.com

effect key proteins GLUT1, LDH decreased significantly, glucose consumption level, lactic acid level and ATP level decreased significantly. Key proteins of protein kinase B/mammalian target of rapamycin (AKT/mTOR) signaling pathway were detected, and it was found that the levels of p-AKT and p-mTOR proteins decreased significantly after SQLE expression was down-regulated. **Conclusion** SQLE is highly expressed in ovarian cancer and may promote glucose metabolism and inhibit apoptosis of ovarian cancer cells through AKT/mTOR signaling pathway.

Key words: squalene epoxidase; ovarian tumor; protein kinase B/mammalian target of rapamycin signaling pathway; glucose metabolism

卵巢癌是女性常见的妇科恶性肿瘤^[1]。它的流行率和发病率仍然很高,影响到世界上许多妇女。目前,卵巢癌的标准治疗方法包括手术切除和化疗,但由于肿瘤复发和远处转移,卵巢癌患者的 5 年生存率仍小于 50%^[2]。因此,发现卵巢癌分子发病机制、新的预后生物标志物和治疗靶点对卵巢癌的预后和治疗具有重要意义。

角鲨烯环氧化酶(squalene epoxidase, SQLE)在人类染色体 8q24.13 上被发现,催化角鲨烯立体特异性转化为 2,3(S)-氧化二烯,它是胆固醇生物合成的关键步骤,被认为是胆固醇合成的第二限速酶^[3]。研究报道^[4-5],SQLE 在许多恶性肿瘤中过表达, SQLE 在乳腺癌^[6]、结肠癌^[7]等表达差异,高表达促进癌症的发生。研究表明 SQLE 作为 miR-205 的直接下游靶基因,影响前列腺癌的预后^[8]。代谢紊乱、过度肥胖、脂肪因子可能与卵巢癌的发病、恶性进展以及耐药等有关,既是卵巢癌发病的原因之一,又导致了卵巢癌的恶性进展以及极差的预后。SQLE 作为胆固醇代谢相关基因在卵巢癌中是否也存在与前列腺癌相类似调控癌症的作用。本研究通过观察 SQLE 对卵巢癌细胞增殖和凋亡的影响,及对糖代谢的影响,以期对卵巢癌的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象 本课题组收集蚌埠医学院第一附属医院 2022 年 1 月至 2022 年 12 月妇科手术的 50 例卵巢癌患者相关信息,及其手术切除癌组织及癌旁正常组织(距离癌切缘 ≥ 3 cm)。术中采集的标本立即放入 -80 °C 冰箱保存,留为后续实验使用。所有病人均有明确的诊断,且术前均未接受过任何治疗。所有患者均签署知情同意书,且本研究由蚌埠医学院第一附属医院伦理委员会批准。

1.2 细胞培养及其主要试剂 正常人源卵巢细胞 IOSE-80 和卵巢癌细胞 OVCAR-3、ES-2、A2780 购自上海中科院细胞库;使用 10% 胎牛血清(FBS)(赛默飞有限公司)的 1640 培养基(赛默飞有限公司)培养,培养基包含 10% 胎牛血清(赛默飞有限公司)+1% 青链霉素。细胞在 37 °C、含 5% CO₂ 的培养箱中培养。敲

减 SQLE(si-SQLE)及对照 NC 的慢病毒由合元生物技术(上海)股份有限公司设计合成;四甲基偶氮唑盐(MTT)购自北京索莱宝科技有限公司;Western Blot 试剂盒及 BCA 蛋白浓度测量试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;Annexin V - FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒购自上海贝博生物技术有限公司;6 孔板购自于 NEST 公司;一抗(SQLE、GLUT1、LDH、AKT、mTOR、p-AKT、p-mTOR 和 GAPDH)均购买于 Abcam 公司,二抗购于武汉三鹰生物技术有限公司;葡萄糖、乳酸、腺嘌呤核苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)检测试剂盒购自赛默飞有限公司。

1.3 细胞转染 取对数生长期细胞,于转染前 24 h 将细胞以 3.0×10^4 个/孔接种于 6 孔板;转染时按照脂质体 Lipofectamine TM2000 转染试剂盒说明书, A2780 细胞转染敲减 SQLE 及对照组试剂,记作 si-SQLE 及 NC。转染时加入相应试剂并混合均匀,将细胞培养基换为无血清培养基,5% CO₂、37 °C 条件培养箱培养 6 h 后更换新鲜培养基,然后进行后续实验。序列为 si-SQLE:5'-GCCGGGUGGUUAUCAUGUUTT-3'。

1.4 克隆实验 克隆实验检测增殖情况,取转染好的细胞消化离心后,以 1 000 个/孔的密度种植于 6 孔板中,加入含 10% 的培养基,随后培养 10 d。去上清后,加入 4% 的多聚甲醛固定 30 min 后,加入 1:8 稀释后的结晶紫染液,染色 30 min 后 PBS 冲洗 3~4 遍,拍照计数。

1.5 流式细胞术检测细胞凋亡情况 收集各组转染后细胞培养皿中的上清液,消化细胞,适度离心,丢弃上清液,加入 PBS 轻轻洗涤,再次适度离心,丢弃上清液,加入适量结合液,严格按照凋亡试剂盒说明书避光加入染料,最后用滤膜滤过细胞碎片,上流式细胞仪进行检测。

1.6 Western Blot 实验 收集细胞,用裂解液(上海碧云天生物技术有限公司生产)提取总蛋白裂解物,用于蛋白印迹实验,使用 BCA 蛋白检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司生产)测定蛋白浓度。待定量后,将等量配置好的蛋白质(40 μ g)加载到凝胶上,在

10%凝胶上电泳分离,然后转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上。用 TBST 洗膜 5 分钟/次,共 3 次,用 5%脱脂乳溶液封闭 PVDF 膜封闭 1 h,然后与一抗抗体(1:1000)的一抗孵化,4℃孵育过夜。第 2 天用 TBST 溶液清洗膜 3 次,再与二抗在 37℃下孵育 1 h。

1.7 检测葡萄糖、乳酸和 ATP 的含量 将培养 24 h 的细胞上清液,按照葡萄糖检测试剂盒和乳酸检测试剂盒的说明书进行处理,使用酶标记,在 505 nm 和 530 nm 处测量上清液的吸光度。按照 ATP 检测试剂盒说明书要求,取细胞悬浮液,将基质和缓冲液混合制成测试溶液。将测试溶液加入细胞中并混合以使细胞完全裂解。使用可检测化学发光的多功能酶标记物在 636 nm 处测定吸光度。

1.8 统计学方法 采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析,利用 GraphPad Prism 7.0 软件进行统计分析和作图。所有数据均进行正态分布和方差齐性检验,计量数据均以($\bar{x} \pm s$)表示。两组间的比较采用两独立样本 t 检验。癌组织和癌旁组织 SQLE 表达阳性率采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SQLE 在卵巢癌患者中高表达 免疫组化检测

结果显示,卵巢癌组织蜡块与其相匹配的癌旁正常组织中,SQLE 蛋白在癌组织中阳性表达明显高于癌旁正常组织($P < 0.001$),见表 1 和图 1。

表 1 SQLE 在卵巢癌组织及癌旁组织中的表达水平

组别	n	SQLE		χ^2	P
		阴性	阳性		
癌组织	50	6	44	28.693	<0.001
癌旁组织	50	32	18		

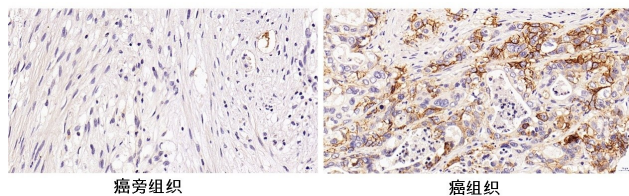
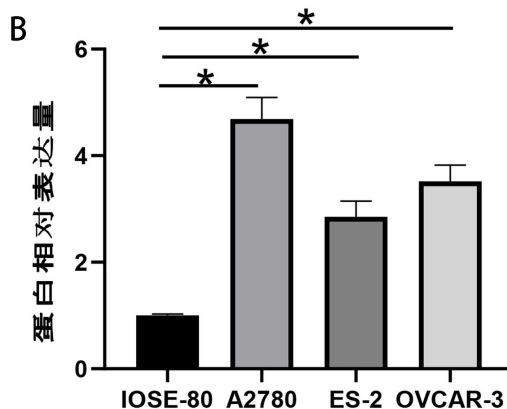
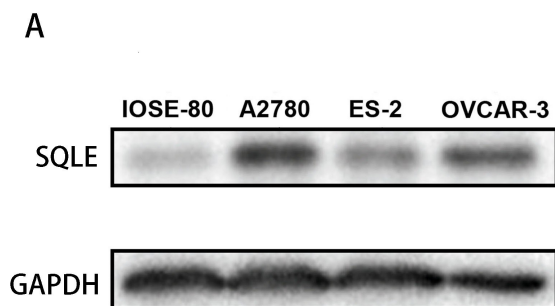


图 1 SQLE 在卵巢癌组织及癌旁组织中的表达水平

2.2 SQLE 在卵巢癌细胞中高表达 通过蛋白印迹检测实验检测 SQLE 在卵巢癌细胞中的表达情况,结果显示,与 IOSE-80 相比,在卵巢癌细胞系 A2780、ES-2 和 OVCAR-3 中的 SQLE 表达明显增加,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 2。



注:A. Western Blot 检测 SQLE 在卵巢癌细胞株中的蛋白表达量;B. SQLE 蛋白的表达量($n = 3$). * $P < 0.05$ 。

图 2 SQLE 在卵巢癌细胞中表达情况

2.3 SQLE 转染效率检测 转染后 24 h 后通过蛋白印迹实验检测 SQLE 的表达情况,确定转染效率。结果显示,在 A2780 卵巢癌细胞中,相较于 NC 组,si-SQLE 组中的 SQLE 表达水平显著下降,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 3。

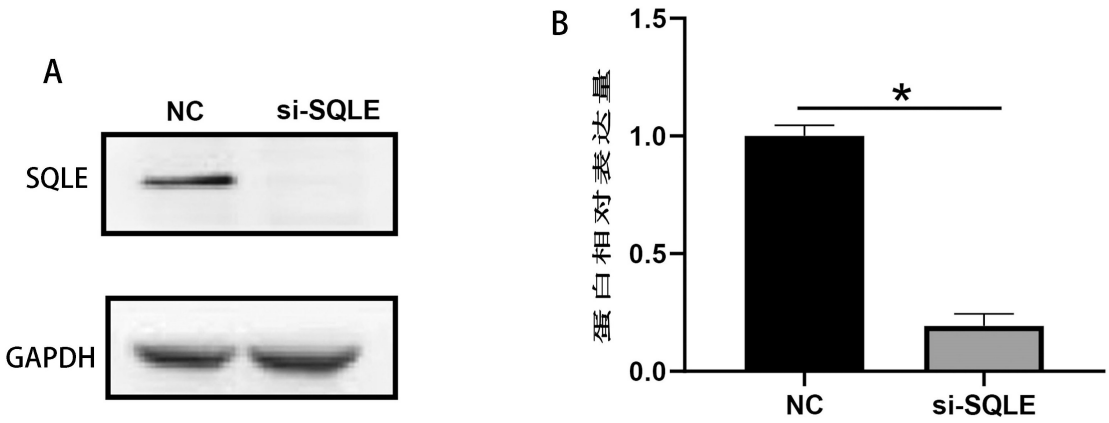
2.4 敲减 SQLE 表达抑制卵巢癌细胞增殖 克隆实验显示,敲减 SQLE 表达水平后,si-SQLE 组在 A2780 卵巢癌细胞中,相较于 NC 组细胞克隆数目显著减少,两组差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见图 4。

2.5 敲减 SQLE 表达促进 A2780 卵巢癌细胞凋亡

流式细胞术结果显示,敲减 SQLE 表达后相较于对照组 NC,si-SQLE 组细胞凋亡率增加,差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。见图 5。

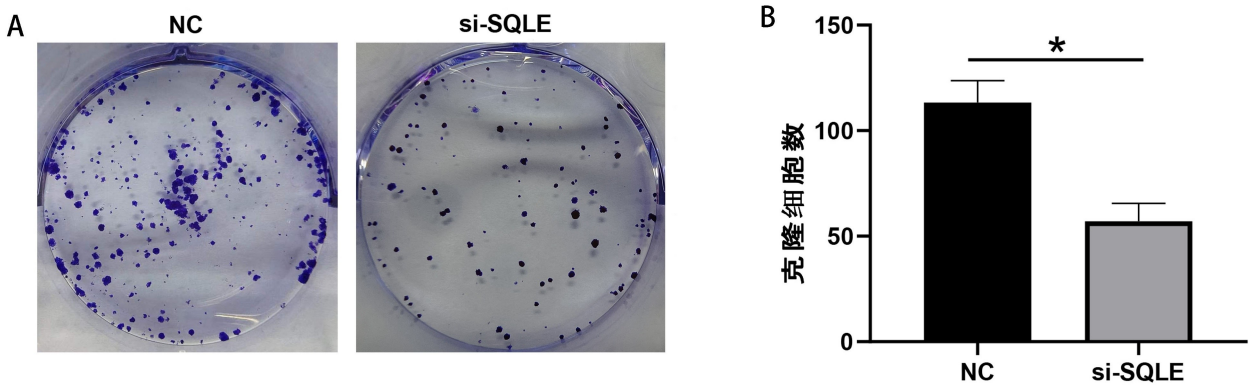
2.6 SQLE 对沃伯格效应影响 在 A2780 卵巢癌细胞中,相较于 NC 组,si-SQLE 组蛋白 GLUT1、LDH 表达显著下降($P < 0.05$)。见图 6。

2.7 敲减 SQLE 表达后抑制卵巢癌细胞葡萄糖、乳酸和 ATP 的含量 与 NC 对照组相比,抑制 SQLE 表达后细胞葡萄糖消耗水平显著降低($P < 0.05$),乳酸水平和 ATP 水平显著降低($P < 0.05$)。见图 7。



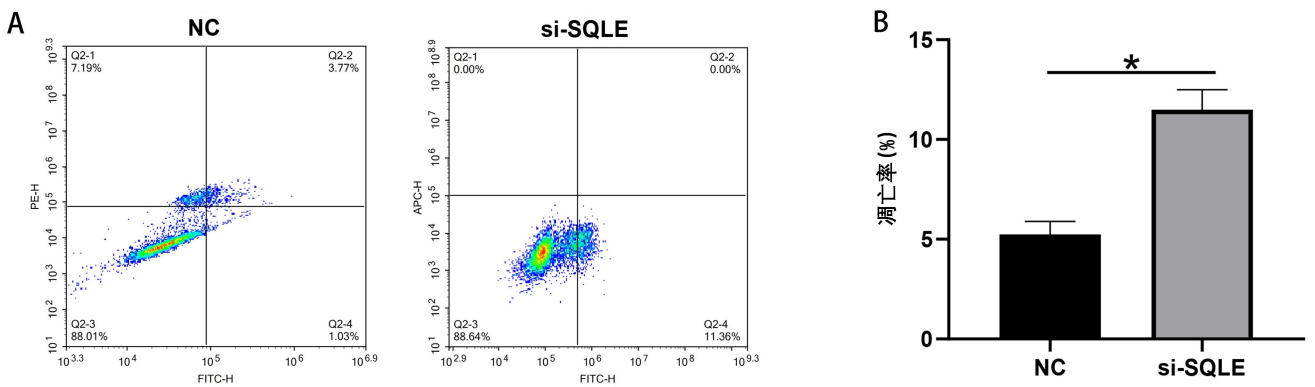
注:A. Western Blot 检测敲减后 SQLE 的蛋白表达量;B. SQLE 蛋白表达量($n=3$)* $P<0.05$ 。

图 3 SQLE 转染效率



注:A. 克隆形成实验;B. 克隆形成统计结果。* $P<0.05$ 。

图 4 A2780 细胞株克隆实验检测



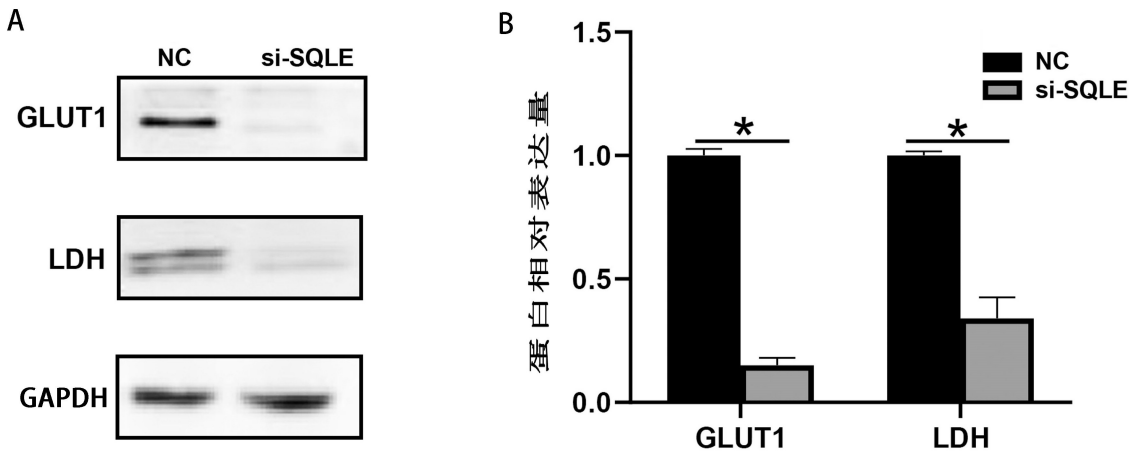
注:A. 流式细胞仪检测凋亡细胞;B. 统计凋亡结果。* $P<0.05$ 。

图 5 SQLE 对卵巢癌细胞凋亡的影响

2.8 敲减 SQLE 表达后抑制蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素靶点 (protein kinase B/mammalian target of rapamycin, AKT/mTOR) 信号通路蛋白 Western Blot 实验显示,敲减 SQLE 表达水平后,与 NC 组比较,si-SQLE 组中的 AKT、mTOR 蛋白水平差异无统计学意义,p-AKT、p-mTOR 蛋白水平显著下降,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 8。

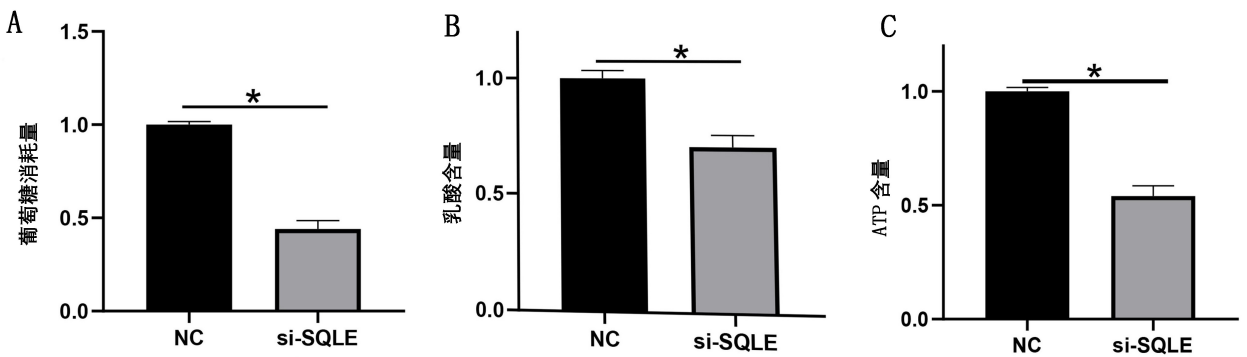
3 讨论

卵巢癌是世界范围内女性癌症相关死亡的最常见原因之一。尽管手术和靶向化疗取得了一定进展,但由于复发和化疗耐药,预后仅略有改善^[9]。并且卵巢癌早期病变不易被发现,晚期病例患者的治疗方法有限^[10]。因此,深入了解卵巢癌的发病机制,对于制定新的治疗策略,改善卵巢癌患者的整体预后具有重要



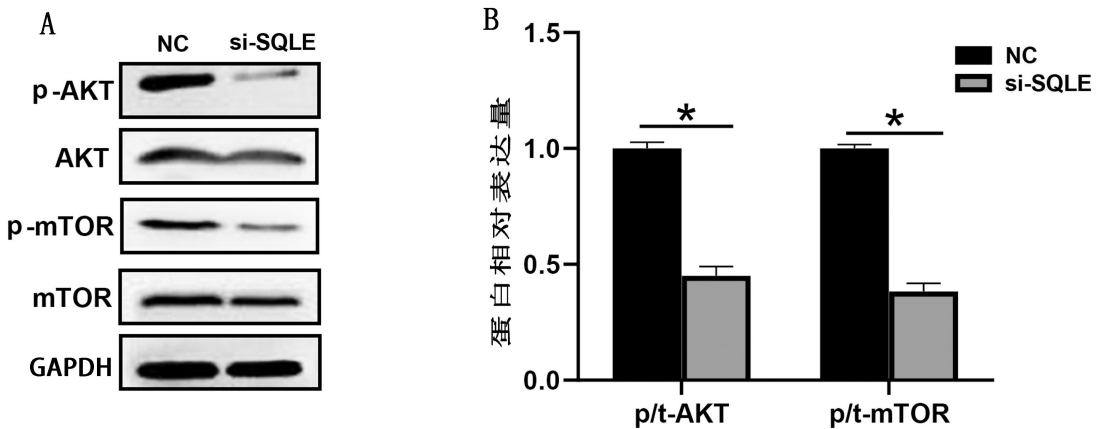
注:A. Western Blot 检测敲减 SQLE 后的糖代谢蛋白表达量;B. 统计蛋白表达量结果($n=3$)* $P<0.05$ 。

图 6 SQLE 对沃伯格效应的影响



注:A. 葡萄糖消耗;B. 乳酸含量;C. ATP 含量.* $P<0.05$ 。

图 7 SQLE 表达变化对卵巢癌细胞葡萄糖、乳酸、ATP 水平的影响



注:A. Western Blot 检测敲减 SQLE 后的 AKT/mTOR 信号通路蛋白表达量;

B. 统计蛋白表达量结果($n=3$)* $P<0.05$ 。

图 8 SQLE 对 AKT/mTOR 信号通路蛋白的影响

意义。SQLE 是胆固醇合成一个关键酶。研究发现, SQLE 在多种肿瘤中通过不同途径发挥促癌因子的作用^[11-12]。然而, SQLE 在卵巢癌中的作用机制尚不清楚。本课题组收集本院 50 例卵巢癌患者临床数据, 免疫组化检测发现 SQLE 在卵巢癌组织中高表达。同时, 进一步利用蛋白印迹方法, 检测 SQLE 在卵巢癌细

胞株中的表达情况, 验证了 SQLE 在卵巢癌中高表达。这些研究结果均提示 SQLE 在卵巢癌中可能是促癌因素。为了进一步研究 SQLE 对卵巢癌的影响, 本课题组利用转染技术, 通过体外实验检验 SQLE 对增殖及凋亡的影响。克隆形成结果显示, 敲减 SQLE 后, A2780 卵巢癌细胞增殖能力受到抑制。流式细胞仪结

果显示,敲减 SQLE 后促进了 A2780 卵巢癌细胞的凋亡。这些结果说明 SQLE 影响卵巢癌的发生和发展。

肿瘤的发生与多种因素相关。癌细胞中的能量代谢通过称为沃伯格效应的过程不同于正常细胞。这种代谢重编程的特点是,即使在存在足够氧气的情况下,癌细胞或其他高度增殖的细胞也倾向于将葡萄糖代谢成乳酸,而不是丙酮酸(有氧糖酵解)。这种现象为癌细胞提供了生长优势,帮助它们逃避凋亡并促进肿瘤转移^[13-14]。虽然,有一些文献报道,SQLE 与胆固醇代谢相关,但是,SQLE 是否影响糖代谢少见有报道。本课题组为了探索 SQLE 对卵巢癌影响的机制,通过蛋白印迹实验检测沃伯格效应关键蛋白,结果显示,敲减 SQLE 表达水平后,蛋白 GLUT1、LDH 表达显著下降。抑制 SQLE 表达后细胞葡萄糖消耗水平显著降低,乳酸水平和 ATP 水平显著降低,推测 SQLE 可能通过影响糖代谢影响卵巢癌的发生发展。AKT/mTOR 信号通路参与多种癌症进程,是人们熟知的信号通路^[15-16]。mTOR 是两种蛋白质复合物的催化亚基,而 PI3K-AKT 通路是 mTOR 通路的重要调控因子^[17]。AKT 可以通过 CAT 结构域介导酶活性,这是 AKT 激活所必需的磷酸肌醇依赖性激酶 1(PDK1)依赖性磷酸化位点,从而激活 mTORC1。mTOR 通路被认为是代谢功能的关键调节因子。mTORC1 通过上调转录因子如 HIF1 α 的激活参与葡萄糖摄取和糖酵解。有研究证明,一些蛋白可以通过激活 AKT/mTOR 信号通路影响糖代谢,进而影响癌症的发生发展^[18-19]。本课题组利用蛋白印迹实验检测 AKT/mTOR 信号通路关键蛋白,验证 SQLE 是否通过 AKT/mTOR 信号通路影响卵巢癌。结果显示,敲减 SQLE 表达水平后,AKT/mTOR 信号通路关键蛋白表达也随之下降。这表明 SQLE 可能调控 AKT/mTOR 信号通路。综合本研究前期实验结果,抑制 SQLE 表达后细胞葡萄糖消耗水平显著降低,乳酸水平和 ATP 水平显著降低,间接推测 SQLE 可能调控 AKT/mTOR 信号通路调控糖代谢。

综上所述,本研究主要发现 SQLE 在卵巢癌中表达明显升高,并且可能通过 AKT/mTOR 信号通路调控糖代谢及细胞凋亡,这为日后治疗卵巢癌提供了新思路。

参考文献:

[1] SIEGEL R L, MILLER K D, WAGLE N S, et al. Cancer statistics, 2023[J]. CA Cancer J Clin, 2023, 73(1): 17-48.
[2] FENG W L, DEAN D C, HORNICEK F J, et al. Exosomes promote pre-metastatic niche formation in ovarian cancer[J]. Mol Cancer, 2019, 18(1): 124.

[3] WANG S H, DONG L, MA L, et al. SQLE facilitates the pancreatic cancer progression via the lncRNA-TTN-AS1/miR-133b/SQLE axis[J]. J Cell Mol Med, 2022, 26(13): 3636-3647.
[4] LI C G, WANG Y, LIU D B, et al. Squalene epoxidase drives cancer cell proliferation and promotes gut dysbiosis to accelerate colorectal carcinogenesis[J]. Gut, 2022, 71(11): 2253-2265.
[5] HE L W, LI H G, PAN C Y, et al. Squalene epoxidase promotes colorectal cancer cell proliferation through accumulating calcitriol and activating CYP24A1-mediated MAPK signaling[J]. Cancer Commun (Lond), 2021, 41(8): 726-746.
[6] TANG W Q, XU F S, ZHAO M, et al. Ferroptosis regulators, especially SQLE, play an important role in prognosis, progression and immune environment of breast cancer[J]. BMC Cancer, 2021, 21(1): 1160.
[7] SUN H S, LI L, LI W, et al. p53 transcriptionally regulates SQLE to repress cholesterol synthesis and tumor growth[J]. EMBO Rep, 2021, 22(10): e52537.
[8] KALOGIROU C, LINXWEILER J, SCHMUCKER P, et al. MiR-205-driven downregulation of cholesterol biosynthesis through SQLE-inhibition identifies therapeutic vulnerability in aggressive prostate cancer[J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 5066.
[9] XU F, LI J J, NI M D, et al. FBW₇ suppresses ovarian cancer development by targeting the N⁶-methyladenosine binding protein YTHDF₂ [J]. Mol Cancer, 2021, 20(1): 45.
[10] PERES L C, CUSHING-HAUGEN K L, KÖBEL M, et al. Invasive epithelial ovarian cancer survival by histotype and disease stage[J]. J Natl Cancer Inst, 2019, 111(1): 60-68.
[11] YOU W Q, KE J, CHEN Y F, et al. SQLE, A key enzyme in cholesterol metabolism, correlates with tumor immune infiltration and immunotherapy outcome of pancreatic adenocarcinoma[J]. Front Immunol, 2022, 13: 864244.
[12] YAO L, LI J N, ZHANG X, et al. Downregulated ferroptosis-related gene SQLE facilitates temozolomide chemoresistance, and invasion and affects immune regulation in glioblastoma[J]. CNS Neurosci Ther, 2022, 28(12): 2104-2115.
[13] XU Y Q, CHEN W C, LIANG J, et al. The miR-1185-2-3p-GOLPH₃L pathway promotes glucose metabolism in breast cancer by stabilizing p53-induced SERPINE1[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2021, 40(1): 47.
[14] KIM H, SON S, KO Y, et al. CTGF regulates cell proliferation, migration, and glucose metabolism through activation of FAK signaling in triple-negative breast cancer

- [J]. *Oncogene*, 2021, 40(15): 2667-2681.
- [15] WANG D D, JIN X Y, LEI M X, et al. USF₁-ATRAPPBX₃ axis promote breast cancer glycolysis and malignant phenotype by activating AKT/mTOR signaling[J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18(6): 2452-2471.
- [16] 徐伟鑫, 王春芳, 罗艳红. 松花粉对于肝癌细胞株 SMMC-7721 的生物学作用及与 α -烯醇酶及其下游 PI3K/AKT 信号通路蛋白的关联作用[J]. *右江民族医学院学报*, 2023, 45(1): 15-21.
- [17] CHEN S, TAO Y H, WANG Q, et al. Glucose induced-AKT/mTOR activation accelerates glycolysis and promotes cell survival in acute myeloid leukemia[J]. *Leuk Res*, 2023, 128: 107059.
- [18] SUN Y, LIU W J, ZHAO Q Y, et al. Down-Regulating the expression of miRNA-21 inhibits the glucose metabolism of A549/DDP cells and promotes cell death through the PI3K/AKT/mTOR/HIF-1 α pathway[J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 653596.
- [19] LIN S J, CHEN C, OUYANG P, et al. SELENOM knockout induces synaptic deficits and cognitive dysfunction by influencing brain glucose metabolism[J]. *J Agric Food Chem*, 2023, 71(3): 1607-1619.
- 收稿日期: 2023-04-05; 修回日期: 2023-05-08
-
- (上接第 556 页)
- [12] RAZA W, KRACHLER B, FORSBERG B, et al. Air pollution, physical activity and ischaemic heart disease: a prospective cohort study of interaction effects[J]. *BMJ Open*, 2021, 11(4): e040912.
- [13] SUN S E, CAO W N, QIU H, et al. Benefits of physical activity not affected by air pollution: a prospective cohort study[J]. *Int J Epidemiol*, 2020, 49(1): 142-152.
- [14] GENG G N, ZHENG Y X, ZHANG Q, et al. Drivers of PM_{2.5} air pollution deaths in China 2002-2017[J]. *Nat Geosci*, 2021, 14(9): 645-650.
- [15] XI Y Z, RICHARDSON D B, KSHIRSAGAR A V, et al. Effects of short-term ambient PM_{2.5} exposure on cardiovascular disease incidence and mortality among U. S. hemodialysis patients: a retrospective cohort study[J]. *Environ Health*, 2022, 21(1): 33.
- [16] NAGATA J M, VITTINGHOFF E, GABRIEL K P, et al. Physical activity from young adulthood to middle age and premature cardiovascular disease events: a 30-year population-based cohort study[J]. *Int J Behav Nutr Phys Act*, 2022, 19(1): 123.
- [17] JALALI S, KARBAKHS M, MOMENI M, et al. Long-term exposure to PM_{2.5} and cardiovascular disease incidence and mortality in an Eastern Mediterranean country: findings based on a 15-year cohort study[J]. *Environ Health*, 2021, 20(1): 112.
- [18] PETERMAN J E, BASSETT D R, FINCH W H, et al. Associations between active commuting and cardiovascular disease in the United States[J]. *J Phys Act Health*, 2021, 18(12): 1525-1531.
- [19] DEL POZO CRUZ B, AHMADI M N, LEE I M, et al. Prospective associations of daily step counts and intensity with cancer and cardiovascular disease incidence and mortality and all-cause mortality[J]. *JAMA Intern Med*, 2022, 113: e224000.
- [20] LÄANSITIE M, KANGAS M, JOKELAINEN J, et al. Cardiovascular disease risk and all-cause mortality associated with accelerometer-measured physical activity and sedentary time—a prospective population-based study in older adults[J]. *BMC Geriatr*, 2022, 22(1): 729.
- [21] KIM S R, CHOI S, KEUM N, et al. Combined effects of physical activity and air pollution on cardiovascular disease: a population-based study[J]. *J Am Heart Assoc*, 2020, 9(11): e013611.
- [22] TU R Q, HOU J, LIU X T, et al. Physical activity attenuated association of air pollution with estimated 10-year atherosclerotic cardiovascular disease risk in a large rural Chinese adult population: a cross-sectional study[J]. *Environ Int*, 2020, 140: 105819.
- [23] CHOI D, CHOI S, KIM K H, et al. Combined associations of physical activity and particulate matter with subsequent cardiovascular disease risk among 5-year cancer survivors[J]. *J Am Heart Assoc*, 2022, 11(9): e022806.
- [24] LIN Y, YANG X L, LIANG F C, et al. Benefits of active commuting on cardiovascular health modified by ambient fine particulate matter in China: a prospective cohort study[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2021, 224: 112641.
- 收稿日期: 2023-04-05; 修回日期: 2023-06-08