

ERK 1/2 和 P38 信号通路在瘦素诱导巨噬细胞 TNF- α 表达中的作用

赵 婷^{1,2}, 侯孟君¹, 肖勇梅¹, 朱惠莲¹, 唐志红¹, 凌文华¹

(1. 中山大学公共卫生学院, 广东 广州 510080; 2. 仲恺农业技术学院轻工食品学院, 广东 广州 510225)

摘 要:【目的】研究瘦素(leptin)诱导小鼠腹腔巨噬细胞(PM)分泌肿瘤坏死因子(TNF- α)的影响,以及丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路在这一过程中的作用。【方法】体外培养小鼠 PMs,按瘦素不同浓度和/或 MAPK 特异性抑制剂 PD98059、U0126、SB203580、SP600125 进行分组。分别收集培养细胞和上清液,用酶联免疫吸附试验(ELISA)测定培养上清中 TNF- α 水平,用蛋白印迹(Western blot)方法测定细胞内 p-ERK1/2、p-p38,以及 p-JNK 的表达水平,用逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)测定 TNF- α mRNA 的表达。【结果】瘦素能够剂量依赖性的诱导小鼠 PM 产生 TNF- α ,在瘦素质量浓度为 75 ng/mL 时 TNF- α 表达至峰值,是对照组的 6.6 倍。瘦素可以活化 ERK1/2 和 p38 MAPK 信号转导通路,瘦素处理组的 p-ERK1、p-ERK2、p-p38 表达水平分别是对照组的 2.3、2.4 和 2.6 倍。ERK1/2 的特异性抑制剂 PD98059、U0126 和 p38 的特异抑制剂 SB203580 能够分别抑制瘦素引起的 ERK1/2、p38 蛋白磷酸化以及 TNF- α mRNA 增加,两者的联合作用可以强烈抑制 TNF- α mRNA 的表达,而 JNK 信号转导途径与瘦素诱导 PM 表达 TNF- α 无关。【结论】瘦素在小鼠 PM 中通过同时活化 ERK1/2、p38 MAPK 信号转导通路而诱导细胞产生 TNF- α 。

关键词: 瘦素; 巨噬细胞; 肿瘤坏死因子; 丝裂原活化蛋白激酶

中图分类号: R151.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)05-0500-06

Involvement of ERK 1/2 and P38 Signal Pathways in Leptin-Induced TNF- α Expression in Macrophages

ZHAO Ting^{1,2}, HOU Meng-jun¹, XIAO Yong-mei¹, ZHU Hui-lian¹, TANG Zhi-hong¹, LING Wen-hua¹

(1. School of Public Health, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 2. Department of Food Science, Zhongkai Agrotechnical College, Guangzhou 510225, China)

Abstract:【Objective】To study the effects of leptin on tumor necrosis factor (TNF- α) secretion in murine peritoneal macrophages (PM) and the role of mitogen activated protein kinases (MAPK) in this process.【Methods】The murine PMs cultured in vitro were divided into groups according to the concentrations of leptin and/or whether the specific inhibitors of MAPKs, PD98059, U0126, SB203580, and SP600125, were added. Cultured cells and supernatant were collected. The level of TNF- α in the culture supernatant was measured by ELISA and Western blot was used to determine the phosphorylation of ERK1/2, p38 and JNK. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to measure the expression of TNF- α mRNA.【Results】Leptin induced TNF- α expression in murine PMs in a dose-dependent manner and the secretion of TNF- α reached the maximum at 75 ng/mL of leptin, which was 6.6-fold of the control group. ERK1/2 and p38 signaling pathways were activated by leptin in murine PM. Expression of p-ERK1, p-ERK2, and p-p38 in leptin-treated group increased to 2.3, 2.4, and 2.6-fold of the control group, respectively. The specific inhibitors of ERK1/2 and p38 could significantly suppress the activation of ERK1/2 and p38 induced by leptin in murine PM and partly inhibited the TNF- α mRNA expression. Combination of the inhibitors totally abolished the increasing of TNF- α mRNA. Meanwhile, JNK signal pathway was probably not involved in the leptin induced TNF- α production.【Conclusion】Leptin induces TNF- α production by simultaneously activating ERK1/2 and p38 signal pathway in murine PM.

收稿日期: 2006-03-12

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(015042)

作者简介: 赵 婷(1977-),女,河南郑州人,博士,讲师;凌文华,教授,博士生导师,通讯作者。E-mail: whling@gzsums.edu.cn

Key words: leptin; macrophages; tumor necrosis factor- alpha (TNF-); mitogen activated protein kinases (MAPK)

[J SUN Yat- sen Univ(Med Sci), 2006, 27(5):500- 506]

肥胖是2型糖尿病、高血压病、冠心病等的危险因素,严重威胁着人类的健康,但目前为止,肥胖与肥胖相关疾病之间的分子生物学机制尚未被完全阐明。现代医学研究表明,肥胖与炎症反应密切相关,大多数肥胖患者肿瘤坏死因子- (TNF-)的血浆水平显著高于正常体重者,提示炎症因子表达增加在肥胖及肥胖相关疾病的发病中起着重要作用。脂肪组织不仅是脂肪储存和释放的器官,而且具有内分泌功能,能分泌多种脂肪因子,包括瘦素(leptin)、脂联素(adiponectin)、抵抗素(resistin)等,调节机体的能量代谢和平衡。瘦素是由肥胖(ob)基因(位于人类染色体7q32)编码的一种由167个氨基酸组成的分泌型蛋白质,其主要功能是调节体脂和能量平衡。研究显示,瘦素水平的高低与炎症反应也存在一定联系,可能是肥胖相关疾病发病的机制之一。但目前为止,脂肪因子与炎症因子之间的关系尚不清楚。为此,本实验通过研究瘦素对小鼠腹腔巨噬细胞(peritoneal macrophages, PM) TNF- 表达的影响和机制,为阐明肥胖和肥胖相关疾病的发病机理提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 瘦素、SB203580、PD98059、SP600125 购自美国 Sigma 公司,小鼠 TNF- ELISA 检测试剂盒购自美国 R&D 公司,兔抗鼠 p-ERK1/2(Thr202/Tyr204)、p-p38(Thr180/Tyr182)、p-JNK(Thr183/Tyr185)、p38、ERK1/2、JNK 抗体以及辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体、Lumino[®] 发光试剂盒购自美国 Cell Signal Tech 公司,Trizol 购自美国 Invitrogen 公司。cDNA 第一链合成试剂盒和 PCR 扩增试剂盒购自上海生工生物工程有限公司。引物序列均由上海生工生物工程公司纯化合成: TNF- : 正义引物: 5'-ATG AGC ACA GAA AGC ATG ATC-3', 反义引物: 5'-TAC AGG CTT GTC ACT CGA ATT-3'; -actin: 正义引物: 5'-GTG GGC CGC TCT AGG CAC CA-3'; 反义引物: 5'-CGG TTG GCC TTA GGG TTC AGG GGG G-3'。

1.1.2 动物 健康雄性 NIH 纯系小鼠,体质量(25±1)g,8~12 周龄,由广东省实验动物中心提供。

小鼠 PM 的分离培养 用颈椎脱臼法处死小鼠。按文献[1]的方法,无菌取小鼠 PM,台盼蓝染色计数,细胞存活率大于 90%。用含双抗(青霉素 100 IU、链霉素 100 mg/mL)的 RPMI-1640 培养基配制成分密度为 1.5×10^6 /mL 的细胞悬液,接种于 12 孔细胞培养板上(1 mL/孔),置 37℃、体积分数 5%CO₂ 培养 2 h,使细胞贴壁,用 PBS 洗 2 次。

1.2 酶联免疫吸附实验(ELISA)检测瘦素诱导巨噬细胞 TNF- 的表达

按照试剂说明书操作。使用试剂盒中提供的 TNF- 标准品制作标准曲线,用酶标仪测定标准系列和样品在波长为 450 nm 处的吸光度值,根据标准曲线计算出样品中 TNF- 的含量。用独立培养的不同批次细胞重复 3 次,取平均值。

1.3 蛋白印迹(Western blot)检测 p38、ERK1/2 以及 JNK 蛋白的磷酸化水平

1.3.1 总蛋白的提取及浓度测定 在贴壁生长良好的巨噬细胞内根据需要加入不同浓度的瘦素,使其终质量浓度分别为 25、50、75、100、200、500 ng/mL,检测培养上清中 TNF- 蛋白表达的量。体外培养的 PM 中分别加入 MAPK 信号通路的抑制剂[p38 的抑制剂 SB203580(10 μmol/L), ERK1/2 的抑制剂 PD98059(30 μmol/L) 和 U0126(10 μmol/L), JNK 的抑制剂 SP600125(20 μmol/L)] 预处理 1 h 后,再加 75 ng/mL 瘦素共育 2 h。然后在培养细胞中加入细胞裂解液[Tris-HCl(50 mmol/L, pH 8.0), NaCl(150 mmol/L), 质量分数 0.02% NaN₃, 质量分数 0.1% SDS, 100 μg/mL PMSF, 1 μg/mL Aprotinin, 质量分数 1% Nonidet P-40, 质量分数 5% 去氧胆酸钠],冰浴 15 min,用细胞刮小心地将细胞从培养板上刮下来,4 000 r/min (Hettich Zentrifugen, Universal 16R) 离心 5 min,收集上清液, Bradford 法测定总蛋白浓度,应用标准曲线法计算样本中总蛋白浓度,重复 3 次,取其均值。

1.3.2 蛋白印迹实验 采用聚丙烯酰胺垂直板不连续电泳法。在 Bio-Rad 垂直电泳仪中灌注质量分数 12% 的分离胶和质量分数 4.5% 的浓缩胶,每孔

上样 50 μg 总蛋白, 120 V 恒压 20 min 后, 150 V 电泳 60 min。取下凝胶, 将蛋白质转移至 PVDF 膜 (100 V 恒压, 4 h, 90 min), 50 g/L 脱脂奶粉 4 h 封闭过夜。加入兔抗鼠 p-p38、p-ERK1/2、p-JNK 抗体 (1:500), 室温孵育 1 h, 然后加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体 (1:2000), Lumino[®] 发光试剂盒发光, Fuji X 片摄像, 使用 Bandscan 图像分析软件对图像进行定量分析。

1.4 RT-PCR 检测 TNF- α mRNA 表达

1.4.1 引物设计和合成 依照 GenBank 中小鼠 TNF- α 以及作为内参照的 β -actin cDNA 序列并按照引物设计的原则分别进行设计。使用时用无菌去离子水配成 25 pmol/ μL 。

1.4.2 总 RNA 的提取 用 Trizol 试剂抽提细胞的总 RNA, 将所得 RNA 用质量分数 0.1% DEPC 水溶解, 紫外分光光度计测量 A_{260}/A_{280} , 根据比值计算总 RNA 的量, -80°C 保存备用。

1.4.3 逆转录 取细胞总 RNA 2 μg , 以 Oligo(dT)₁₈ 为引物, 在 M-MuLV 逆转录酶的作用下进行逆转录, 反应总体积为 20 μL , 包括 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Oligo(dT)₁₈, 5 \times PCR 反应缓冲液, 20 U/mL RNA 酶抑制剂, 10 mmol/L dNTP 混合液, 20 U/mL M-MuLV 反转录酶, 用无 RNA 酶的超纯水定容至 20 μL 。反应条件为 42 $^{\circ}\text{C}$ 、40 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min, 所获逆转录产物置于 -20°C 保存。

1.4.4 半定量 PCR 取上述逆转录产物 5 μL 作模板, 分别加入 10 \times PCR 缓冲液 5 μL , 20 mmol/L MgCl_2 3 μL , 10 mmol/L dNTP 混合物 2.5 μL , cDNA 5 μL , 上游及下游引物的浓度各为 1.4 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 逆转录产物 1 μL , Taq DNA 聚合酶 2 U, 灭菌水补足至 50 μL , 轻轻混匀。反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min 后, 于 PCR 反应仪 (美国 PE480 型) 中, 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 57 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 进行 28 个循环后, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。反应结束后, 取 PCR 产物 5 μL 于 20 g/L 琼脂糖凝胶中电泳, 紫外灯下观察并拍照, 底片用双波长薄层扫描仪扫描, 得到 TNF- α mRNA 和 β -actin 的相对表达量。

1.5 统计学处理

计量资料用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组均数进行方差齐性检验和单因素方差分析, 方差不齐时, 经变量变换达到齐性; 各组间的两两比较采用 SNK 法。应用 SPSS 13.0 for Windows 进行数据处理与统计学分析, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 瘦素对小鼠 PM 产生 TNF- α 蛋白的影响

在培养的 PM 中待细胞贴壁后加入不同剂量的瘦素 (0-500 ng/mL), 对照组用 RPMI-1640 培养基代替, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2 h 后检测培养液中 TNF- α 蛋白的含量, 观察瘦素质量浓度与 TNF- α 蛋白表达之间的关系。结果发现, 正常情况下, 小鼠 PM 培养上清液中的 TNF- α 蛋白水平较低 [(22.3 \pm 1.5 pg/mL)]。不同质量浓度 (0、25、50、75、100、150、200、500 ng/mL) 的瘦素处理均可以增加培养上清中 TNF- α 的蛋白释放量, 与正常对照组相比, 差异有统计学意义 ($F=439.04, P<0.001$)。在 0-75 ng/mL 范围内, 随着瘦素剂量的增加, 培养上清中 TNF- α 的蛋白释放量也增加, 分别为 (22.3 \pm 1.5)、(80.3 \pm 4.5)、(106.0 \pm 3.6)、(153.7 \pm 5.1) pg/mL (n 值均为 3), 在瘦素质量浓度 75 ng/mL 时达到峰值, 是对照组的 6.6 倍, 差异有统计学意义 ($P<0.01$)。此后, 随着瘦素浓度的继续增加 (100-500 ng/mL), TNF- α 蛋白的释放量保持相对稳定, 分别为 (151.3 \pm 1.5)、(145.0 \pm 5.3)、(143.3 \pm 2.3)、(143.0 \pm 4.6) pg/mL (n 值均为 3) (各组间 $P>0.05$)。

2.2 瘦素对小鼠 PM 表达磷酸化 ERK1/2、p38 以及 JNK 蛋白的影响

本次实验结果显示, 瘦素能够引起小鼠 PM 中 ERK1、ERK2 蛋白磷酸化, 分别是对照组的 2.3、2.4 倍 (n 值均为 3, P 值均小于 0.001)。该作用可被 ERK1/2 的特异性抑制剂 PD98059 或 U0126 抑制 ($n=3, P<0.001$) (图 1)。同样的, 瘦素还能够引起小鼠 PM 中 p38 蛋白的磷酸化, 是对照组的 2.6 倍 ($n=3, P<0.001$), p38 特异阻断剂 SB203580 预处理能够明显降低细胞 p-p38 蛋白的表达, 比瘦素处理组下降 63% ($n=3, P<0.05$) (图 2)。但是, 瘦素不能够激活小鼠 PM 中 JNK 蛋白使之磷酸化 ($n=3, F=3.390, P=0.074$) (图 3)。

2.3 瘦素对小鼠 PM 产生 TNF- α mRNA 的影响

RT-PCR 的结果显示 (图 4), 瘦素 (75 ng/mL) 可使正常小鼠 PM TNF- α mRNA 的表达明显高于对照组, 是对照组的 8.9 倍 ($n=3, P<0.001$)。PD98059、U0126、SB203580 预处理均可不同程度的抑制瘦素引起的 TNF- α mRNA 的表达, 与单独瘦素处理组相比, 差异具有显著性 (n 值均为 3, $P<$

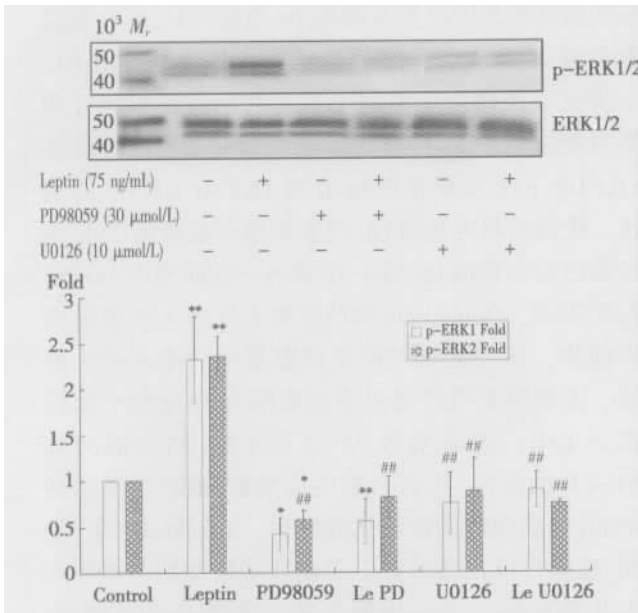


图 1 瘦素 (75 ng/mL) 对小鼠腹腔巨噬细胞表达磷酸化 ERK1/2 蛋白的影响

Fig.1 Effects of leptin (75 ng/mL) on expression of phosphor-ERK 1/2 in murine peritoneal macrophages

n=3 for each group, ANOVA followed by Student- Newman- Keuls test, F=18.6 and F=31.9 for ERK1 and ERK2, respectively, P< 0.001 between groups. * indicates P< 0.05 versus controls, ## indicates P< 0.05 versus leptin alone

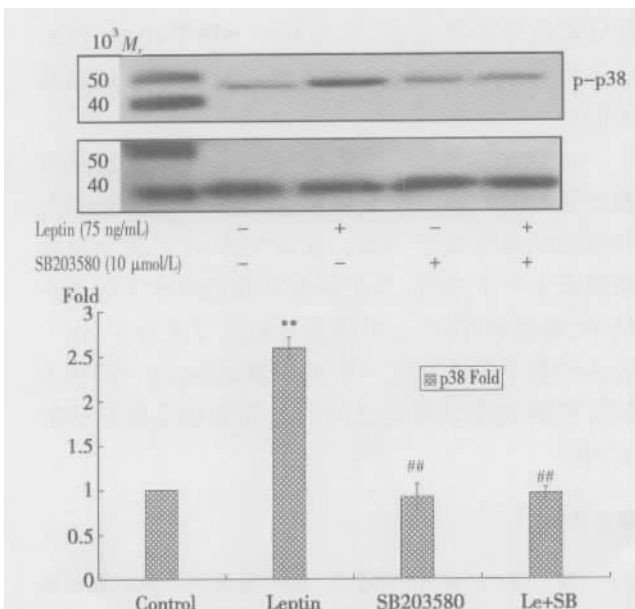


图 2 瘦素(75 ng/mL)对小鼠腹腔巨噬细胞表达磷酸化 p38 蛋白的影响

Fig.2 Effects of leptin (75 ng/mL) on expression of phosphor- p38 in murine peritoneal macrophages

n=3 for each group, ANOVA followed by Student- Newman- Keuls test. F=192.55, P< 0.001 between groups. * indicates P< 0.05 versus controls, ## indicates P< 0.05 versus leptin alone

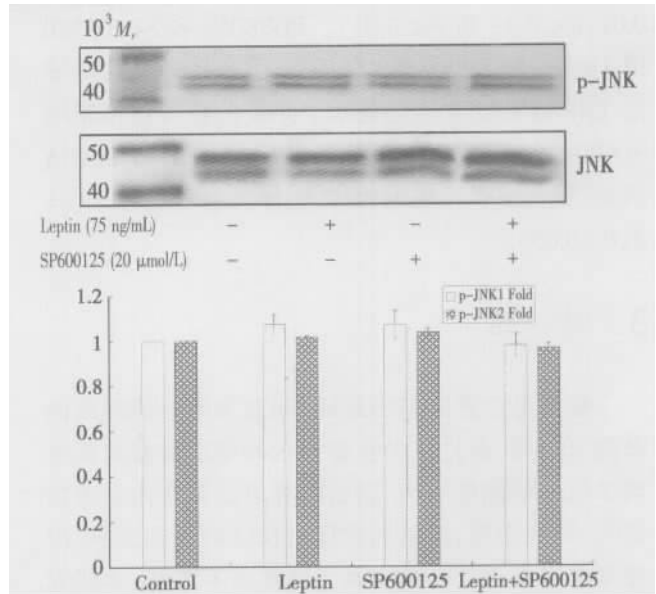


图 3 瘦素(75 ng/mL)诱导小鼠腹腔巨噬细胞表达磷酸化 JNK 蛋白的影响

Fig.3 Effects of leptin (75 ng/mL) on expression of phosphor- JNK in murine PM

n=3 for each group, ANOVA followed by Student- Newman- Keuls test. F=3.390, P=0.074 between groups

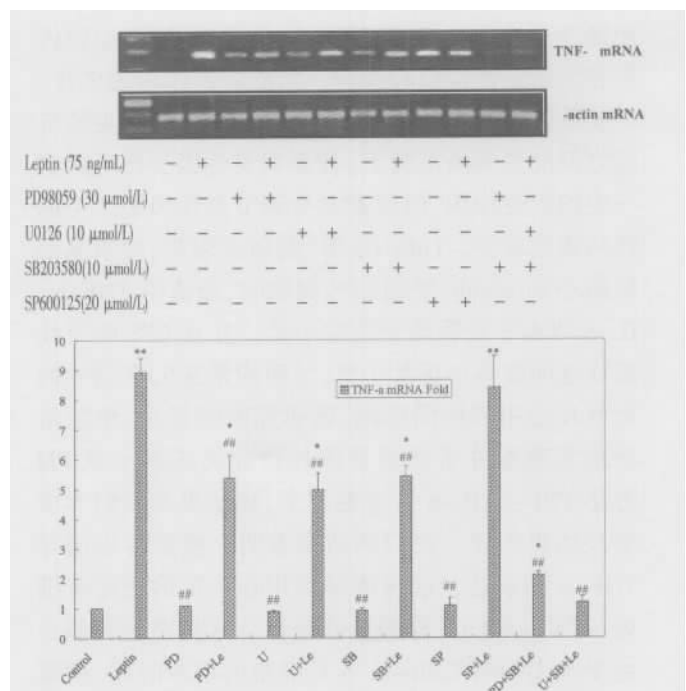


图 4 MAPK 特异性阻断剂对瘦素(75 ng/mL)诱导的小鼠腹腔巨噬细胞表达 TNF- mRNA 的影响

Fig.4 Effects of specific inhibitors for MAPK on expression of TNF- mRNA induced by leptin (75 ng/mL) in murine PM

n=3 for each group, ANOVA followed by Student- Newman- Keuls test. F=186.63, P< 0.001 between groups. * indicates P< 0.05 versus controls, ## indicates P< 0.05 versus leptin alone

0.01, $P < 0.01$ 和 $P < 0.01$)。PD98059 和 SB203580 或 U0126 和 SB203580 联用可显著抑制瘦素诱导的 TNF- α mRNA 表达增加。JNK 的特异性抑制剂 SP600125 可部分减少瘦素引起的 TNF- α mRNA 表达, 但与瘦素处理组相比, 差异无显著性意义 ($n=3$, $P > 0.05$)。

3 讨 论

瘦素是由肥胖基因编码、脂肪细胞合成释放的单链蛋白质, 通过减少食物摄入和增加能量消耗来调节机体的能量平衡、脂肪贮存以及某些内分泌功能^[2]。研究表明, 瘦素能够促进机体的炎症反应, 但瘦素本身是否具有免疫调节功能尚不清楚。本研究的结果表明, 体外培养的条件下, 瘦素能够诱导小鼠 PM 合成、分泌 TNF- α 蛋白及 mRNA 表达增加, 这一作用是通过磷酸化 P38、ERK1/2 通路实现的, 而与 MAPK 途径中的 JNK 通路无关。

巨噬细胞是体内重要的免疫细胞, 在受到环境因素的刺激时(如 LPS、内毒素), 可分泌多种细胞因子(如 TNF- α 、IL-1)来调节机体的免疫应答^[3]。肥胖与炎症反应密切相关^[4], 研究发现, 脂肪组织内存在大量的巨噬细胞浸润, 且肥胖者体内的 TNF- α 水平显著增加^[5]。但目前为止, 脂肪因子与炎症反应之间的关系尚不明了。瘦素对炎症因子产生具有一定的促进作用, 但瘦素本身调节炎症因子产生的作用研究较少。Loffreda 等^[6]的研究表明, 瘦素基因缺陷小鼠(ob/ob)受到 LPS 刺激时, 血清中 TNF- α 、IL-6 的水平显著低于正常小鼠, 并且 LPS 的炎症反应也明显弱于正常小鼠, 说明瘦素在 LPS 诱导的炎症反应中起协同作用, 该研究同时显示, 单独给予瘦素刺激并不能诱导体外培养的正常小鼠 PM 分泌 TNF- α 、IL-6 等炎症因子, 该结果与我们本次实验结果矛盾。我们的结果表明, 瘦素可以诱导 TNF- α 的表达, 这种诱导作用在一定的浓度范围内(<75 ng/mL)具有剂量依赖性。这种差异可能是由于本实验与 Loffreda 等对细胞的培养时间、瘦素浓度、所用小鼠品系以及实验方法不同而造成的。

现有的研究发现, MAPK 信号转导通路是瘦素作用的重要信号通路之一, 瘦素可在许多细胞中激活 MAPK 信号通路。Cao 等^[7]发现在人肝脏星状细胞, 瘦素能够通过激活 ERK1/2 和 p38 诱导产生 TIMP-1, 造成肝细胞纤维化。此外, 在下丘脑^[8]、肝

脏^[9]、脂肪细胞^[10]以及人胰岛 β -细胞^[11]中, 均发现瘦素能够激活 MAPK 信号通路而发挥生物学作用。本研究使用体外培养的小鼠腹腔巨噬细胞研究瘦素对炎症因子 TNF- α 的影响, 发现瘦素能够激活 ERK1/2、p38 从而相应地增加 TNF- α mRNA 的表达。我们的研究还发现, 瘦素刺激不能激活 JNK 信号蛋白使之磷酸化。这一结果与一些研究者的报道有所不同。Bouloumie 等^[12]用瘦素处理人脐静脉内皮细胞, 研究瘦素对内皮细胞氧化应激水平的影响, 发现瘦素可以通过增加细胞内 ROS 的产生而激活 JNK, 进而增加 AP-1 的 DNA 结合能力和 NF- κ B 的活性, 从而引起内皮细胞 MCP-1 表达的增加, 导致动脉粥样硬化的发生。Takekoshi 等^[13]发现, 瘦素可以在猪的肾上腺髓质嗜铬细胞中诱导产生儿茶酚胺, 这一作用是通过依赖 Ca^{2+} 的 PKC-MAPK 通路实现的。在这一过程中, 瘦素通过活化 Ca^{2+} 依赖的 PKC 信号通路, 使 ERK 和 JNK 蛋白磷酸化, 从而引起细胞内儿茶酚胺的表达增加。该研究的结果还显示, 瘦素不能激活 p38 蛋白, 瘦素处理对 p38 蛋白的活性无影响。本次实验的结果与上述研究略有不同, 这种差异可能是因为所用细胞的种属、种类不同或者细胞内信号通路本身确有差异。以上结果说明, 在哺乳动物细胞, 瘦素能够激活 MAPK 信号转导通路, 从而发挥生物学功能, 但对于不同的细胞和蛋白, 瘦素激活的 MAPK 通路是不同的。

动物实验表明, TNF- α 处理可使豚鼠血浆瘦素水平升高和脂肪细胞中瘦素 mRNA 表达增加^[14]。同样的结果可见于小鼠, 注射 TNF- α 可使小鼠血浆瘦素水平上升^[15]。以上研究和我们本次实验结果提示, 瘦素和 TNF- α 可能通过相互促进表达, 这一表达过程中可能存在一个正反馈通路, 这一机制为研究肥胖与炎症反应之间的关系提供了新的研究方向。

参考文献:

- [1] 高 潮, 王润田, 刘殿武. 参麦对烧伤小鼠巨噬细胞 TNF- α mRNA 表达的影响[J]. 中华烧伤杂志, 2000, 16(5): 289-291.
- [2] CORALIA P, CARMEN F G, TERESA F A, et al. Leptin impairs insulin signaling in rat adipocytes [J]. Diabetes, 2004, 53(2): 347-353.
- [3] OTERO M, LAGO R, GOMEZ R, et al. Leptin: a metabolic hormone that functions like a proinflammatory

- adipokine[J]. *Drug News Perspect*, 2006, 19(1): 21- 26.
- [4] JUGE- AUBRY C E, HENRICHOT E, MEIER C A. Adipose tissue: a regulator of inflammation[J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2005, 19(4): 547- 566.
- [5] FANTUZZI G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2005, 115(5): 911- 919
- [6] LOFFREDA S, YANG S Q, LIN H Z, et al. Leptin regulates proinflammatory immune responses[J]. *FASEB J*, 1998, 12(1): 57- 65.
- [7] CAO Q, MAK K M, REN C L, et al. Leptin stimulates tissue inhibitor of metalloproteinase- 1 in human hepatic stellate cells[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(6): 4292- 4304.
- [8] BJORBACK C, EL- HASCHIMI K, FRANTZ J D, et al. The role of SOCS- 3 in leptin signaling and leptin resistance[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(42): 30059- 30065.
- [9] FIGENSCHAU Y, KNUTSEN G, SHAHAZEYDI S, et al. Human articular chondrocytes express functional leptin receptors[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 287(1): 190- 197.
- [10] MACHINAL- QUELIN F, DIEUDONNE MN, LENEVEU MC, et al. Proadipogenic effect of leptin on rat preadipocytes in vitro: activation of MAPK and STAT3 signaling pathways[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2002, 282(4): C853- C863.
- [11] TANABE K, OKUYA S, TANIZAWA Y, et al. Leptin induces proliferation of pancreatic beta cell line MIN6 through activation of mitogen- activated protein kinase[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 241(3): 765- 768.
- [12] BOULOUMIE A, MARUMO T, LAFONTAN M, et al. Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells[J]. *FASEB J*, 1999, 13(10): 1231- 1238.
- [13] TAKEKOSHI K, ISHII K, NANMOKU T, et al. Leptin stimulates catecholamine synthesis in a PKC- dependent manner in cultured porcine adrenal medullary chromaffin cells[J]. *Endocrinology*, 2001, 142(11): 4861- 4867.
- [14] GRUNFELD C, ZHAO C, FULLER J, et al. Weight- reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene[J]. *Science*, 1995, 269(5223): 543- 546.
- [15] FRANCHIMONT D, ROLAND S, GUSTOT T, et al. Impact of infliximab on serum leptin levels in patients with Crohn's disease[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90(6): 3510- 3516.

(编辑 张敏瑞)

(上接第 499 页 from page 499)

深入研究 AEC 增殖、分化、液体转运、合成分泌的功能, 在肺发育成熟等生理过程中的作用机制及其在肺损伤、修复等病理生理情况下的改变情况等。这可能需要寻找能够刺激上皮细胞的生长因子, 或者在不断发现 AEC 表面某些特异标记的基础上, 结合免疫学技术研究新的提取方法达到纯度更高、细胞损伤更小。

参考文献:

- [1] 毛宝龄, 钱桂生, 陈正堂. 急性呼吸窘迫综合征[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 58- 59.
- [2] LI Y, YANG T, LIU Q, ET A L. Effect of isoflurane on proliferation and Na⁺, K⁺ ATPase activity of alveolar type II cells injured by hydrogen peroxide [J]. *Drug Metabol Drug Interact*, 2004, 20(3): 175- 183.
- [3] DE MOURA E G, PASSOS M C. Neonatal programming of body weight regulation and energetic metabolism[J]. *Biosci Rep*, 2005, 25(3- 4): 251- 269.
- [4] PETRY C J, OZANNE S E, HALES C N. Programming of intermediary metabolism [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2001, 185(1- 2): 81- 91.
- [5] DOBBS L G, GONZALEZ R, WILLIAMS M C. An improved method for isolating type II cells in high yield and purity [J]. *Rev Respir Dis*, 1986, 134(32): 141- 145.
- [6] M C HENSON, K F SWANL, D E EDWARDS, et al. Receptor expression in fetal lung increases in late gestation in the baboon: a model for human pregnancy [J]. *Reproduction*, 2004, 127(3): 87- 94.
- [7] GONZALEZ R, YANG Y H, GRIFFIN C, et al. Freshly isolated rat alveolar type II cells, type II cells, and cultured type II cells have distinct molecular phenotypes[J]. *Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2005, 288(1): 179- 189.
- [8] CHANG L W, ZHU H P, LI W B, et al. Protective effects of amygdalin on hyperoxia-exposed type II alveolar epithelial cells isolated from premature rat lungs in vitro[J]. *Zhonghua Er Ke Za Zhi*, 2005, 43(2): 118- 123.

(编辑 张恩健)