

降糖消渴颗粒含药血清对 INS-1 细胞磷酸肌醇-3 激酶/AKT/FOXO1 通路的影响

莫芳芳¹ 刘海霞¹ 华 静² 赵丹丹¹ 高思华¹

(1 北京中医药大学,北京,100029; 2 北京中医药大学第三附属医院,北京,100029)

摘要 目的:通过研究降糖消渴颗粒含药血清对 INS-1 细胞 PI3K/AKT/FOXO1 通路中相关蛋白与基因表达的影响,探讨降糖消渴颗粒含药血清保护胰岛 B 细胞的分子机制。方法:选取 FOXO1 高表达 INS-1 稳定细胞株,分别以 1%、5%、10%、15%、20% 不同浓度降糖消渴颗粒含药血清干预,用 MTT 法计算细胞成活率以观察药物毒性,分别检测各组细胞中总 FOXO1 蛋白水平以确定最佳药物浓度开展后续实验。细胞用或不用 PI3K 抑制剂 LY294002 干预后,以 Western blotting 检测细胞中总 FOXO1、p-FOXO1、Akt、p-Akt 和细胞核内外的 FOXO1、p-FOXO1 的蛋白表达,qRT-PCR 检测 FOXO1 mRNA 和 Akt mRNA 含量。结果:不同浓度含药血清对细胞均无毒性,其中 10% 为最佳药物干预浓度。10% 含药血清使磷酸化 FOXO1 和 Akt 的表达升高;在胞质和胞核中,10% 含药血清使 FOXO1 的表达降低,磷酸化表达升高,抑制剂 LY294002 使 FOXO1 和 p-FOXO1 表达均降低。实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)结果显示,Akt mRNA 表达升高,FOXO1 mRNA 表达降低,抑制剂使 FOXO1 mRNA 表达降低,结果与 Western blotting 结果一致。结论:降糖消渴颗粒含药血清可通过 PI3K/AKT/FOXO1 通路促进 FOXO1 磷酸化出核以抑制 FOXO 核转录实现保护胰岛 B 细胞的作用。

关键词 肝脾肾同调;降糖消渴颗粒;PI3K/AKT/FOXO1 通路;FOXO1 因子;胰腺;INS-1 细胞;2 型糖尿病;含药血清

Effects of Jiangtang Xiaoke Granules Containing Serum on Phosphoinositide-3

Kinase/AKT/FOXO1 Signaling Pathway in INS-1 Cells

Mo Fangfang¹, Liu Haixia¹, Hua Jing², Zhao Dandan¹, Gao Sihua¹

(1 Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 2 Third Affiliated Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

Abstract Objective: To study the effects of Jiangtang Xiaoke Granules containing serum on expressions of protein and genes of phosphoinositide-3 kinase (PI3K)/AKT/FOXO1 signaling pathway in INS-1 cells to explore the molecular mechanism of serum contained Jiangtang Xiaoke Granules on protecting β -cells. **Methods:** The FOXO1 high expression INS-1 stable cell line was selected and treated with 1%, 5%, 10%, 15% and 20% different concentrations of Jiangtang Xiaoke Granules containing serum. The cell survival rate was calculated by MTT method to observe the toxicity of the drug. The total FOXO1 protein level in each group was detected to determine the optimal drug concentration for subsequent experiments. The cells were transfected with or without the PI3K inhibitor LY294002. Western blotting was used to detect the expression of FOXO1, p-FOXO1, Akt, p-Akt and FOXO1 and p-FOXO1 in the nucleus. The expression of FOXO1 mRNA and Akt mRNA was detected by qRT-PCR. **Results:** Different concentrations of drug-containing serum were not toxic to cells, and 10% of them were the optimal drug intervention concentration. The expression of phosphorylated FOXO1 and Akt was increased with 10% drug-containing serum. In the cytoplasm and nucleus, the expression of FOXO1 was decreased and the expression of phosphorylation was increased with 10% drug-containing serum, and the expression of FOXO1 and p-FOXO1 were decreased by the inhibitor LY294002. The results of real-time quantitative PCR (qRT-PCR) showed that the expression of Akt mRNA was increased, the expression of FOXO1 mRNA was decreased, and the expression of FOXO1 mRNA was decreased by inhibitor. The results were consistent with the results of Western blotting. **Conclusion:** The drug-containing serum of Jiangtang Xiaoke Granules can promote the phosphorylation of FOXO1 through the PI3K/AKT/FOXO1 pathway to inhibit the transcription of FOXO nuclear to protect islet B cells.

Key Words Common regulation of liver, spleen and kidney; Jiangtang Xiaoke Granules, PI3K/AKT/FOXO1 signaling pathway; FOXO1; pancreas; INS-1 cells; Type 2 diabetes mellitus; Serum containing drug

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(NSFC81703971);校内课题资助项目(2016-ZXFZJJ-109)

作者简介:莫芳芳(1982.03—),女,博士,助理研究员,研究方向:脏腑相关理论与中医药防治糖尿病研究,E-mail:xiaofang.tcm@163.com

通信作者:高思华(1957.07—),男,博士,教授,研究方向:运气学说、脏腑相关理论与中医药防治糖尿病,E-mail:gaosihua1216@163.com

中图分类号:R242;R587.1 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2019.02.020

2型糖尿病(Diabetes Mellitus, Type 2, T2DM)是一种以胰岛素分泌不足和胰岛素抵抗为基本特征的慢性糖脂代谢紊乱性疾病^[1-2]。众所周知,胰岛素抵抗是T2DM的最主要病理机制,然而胰岛细胞功能受损导致胰岛素分泌不足在T2DM病理中的作用也越来越受到重视。近年有研究表明胰岛B细胞功能受损可导致胰岛素分泌不足还会降低各组织对胰岛素的敏感性,进一步影响胰岛素抵抗^[3-4]。因此,恢复胰岛B细胞功能应是T2DM治疗的重要方面。

导师高思华教授在多年临证经验中总结出肝脾肾同调治疗T2DM,而降糖消渴颗粒正是在此理论指导下所形成的方剂,目前已经取得了比较满意的临床疗效^[5]。此外,在前期实验中已经证实,降糖消渴颗粒含药血清能够很好的改善INS-1细胞胰岛素分泌功能,促进细胞中FOXO1磷酸化水平^[6]。本研究继续以降糖消渴颗粒含药血清干预INS-1细胞,探讨降糖消渴颗粒对PI3K/AKT/FOXO1通路的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物和细胞 选取SD大鼠20只,雄性,8周龄,体质量180~220 g,平均体质量(200±20)g,购自北京维通利华实验动物中心(合格证号:SCXK(京)2012-0001)。INS-1大鼠胰岛瘤细胞株购自北京协和医学院细胞资源中心。

1.1.2 药物 由北京中医药大学中药科技发展部生产降糖消渴颗粒的成药颗粒剂型,经质量鉴定,颗粒含5.01 g/kg生药,在北京中医药大学糖尿病研究中心实验室内保存药物样品(4℃保存),以备参考。实验临用时,将颗粒混入蒸馏水中配制成所需浓度的混悬液^[7]。

1.1.3 试剂与仪器 电泳和转膜装置、XRS凝胶成像仪(美国Bio-Rad公司);荧光定量PCR仪(美国Thermo公司)。FG,POWER SYBR GREEN PCR(IN-VITROGEN);胎牛血清(EVERY GREEN);β-巯基乙醇(Genview);四环素Doxycycline(Genechem);LY294002抑制剂(Selleck);RNeasy Mini Kit(QIAGEN);青/链霉素(HYCLONE);胰蛋白酶(SOLAR-BIO);RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit(FERMENTAS);AKT抗体、FOXO1抗体和磷酸化Akt(Thr308)抗体(CST);磷酸化FOXO1 A(Ser-256)(Abcam);RPMI-1640培养基、PCR引物购自上

海生工生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 设正常组、模型组、降糖消渴颗粒含药血清组(1%、5%、10%、15%、20%)和LY294002组。按体质量随机分组:对照组10只,降糖消渴颗粒组10只,降糖消渴颗粒大鼠给药剂量是临床人公斤体质量用量的60倍,约每天52.8 g生药/(kg·体质量)。每天早晚灌胃各1次,共7 d。对照组灌胃等量蒸馏水。末次灌胃后1 h,处死大鼠,经腹主动脉取血,4℃静置1 h,3 000 r/min离心20 min,分离含药血清,56℃水浴30 min灭活,微孔滤膜过滤除菌,冻存管分装,-80℃保存备用^[8]。

大鼠胰岛瘤细胞株INS-1培养及模型制备:RPMI-1640培养基加入10%胎牛血清(FBS),100 IU/mL青链霉素,50 μmol/Lβ-巯基乙醇在37℃,5%CO₂条件下无菌培养INS-1细胞,每24 h更换培养基1次,待细胞密度达到70%~80%后细胞传代冻存。细胞传代2次后,细胞密度再次达到80%时应用慢病毒转染的方法将含有FOXO1基因片段的质粒载体转入INS-1细胞,经puromycin筛选获得稳定表达FOXO1细胞株(OE)和阴性对照细胞株(NC),2.5 μg/mL Doxycycline干预12 h诱导FOXO1表达。用实时荧光定量PCR技术检测NC、OE 2种细胞株中FOXO1基因的表达情况。OE组FOXO1基因的表达丰度是NC组的2倍以上说明FOXO1基因转染成功,得到FOXO1高表达INS-1细胞模型^[6]。

分别用20%、15%、10%、5%、1%含药血清干预正常INS-1细胞与FOXO1高表达模型细胞,同时设立正常INS-1细胞对照组与FOXO1高表达模型细胞对照组。

用和不用Dox诱导OE细胞株得到FOXO1高表达模型细胞和正常对照细胞,再用不同浓度的含药血清(20%、15%、10%、5%和1%)处理模型细胞24 h,提取总蛋白,检测FOXO1蛋白的表达。

用或不用Dox诱导FOXO1高表达模型细胞,以10%FBS做对照,加或不加25 μmol/L PI3K抑制剂LY294002和10%含药血清干预24 h。

1.2.2 给药方法 将正常INS-1细胞和FOXO1高表达模型细胞分别以104密度种于24孔板培养12 h,再分别以不同浓度含药血清干预24 h,经指标检测筛选最佳给药浓度后,含药血清组加或不加25 μmol/L PI3K通路抑制剂LY294002培养24 h。

1.2.4 指标检测与方法 1) MTT 检测:将 INS-1 细胞和 FOXO1 高表达模型细胞种于 96 孔板,每孔 4 000 个,12 h 后,分别用 20%、15%、10%、5%、1% 含药血清培养 24 h,弃去液体,每孔加入 90 μ L 的培养基和 10 μ L 5 mg/mL 的 MTT 继续培养 4 h,弃去液体,加 100 μ L 的 DMSO 溶解结晶,在 570 nm 测定吸光度。

2) Western blotting 检测:应用蛋白裂解液与核质蛋白分离提取试剂盒 (Beyotime) 分别提取细胞总蛋白、细胞质蛋白和核蛋白。BCA 试剂盒测定蛋白浓度。以裂解液调整蛋白浓度至相同水平,按 1:1 加入 2X 上样缓冲液稀释,沸水煮 5 min。制备凝胶上样,每个样品加入 30 μ L,总蛋白量 30 μ g,电泳、转膜。将聚偏二氟乙烯膜 (PVDF 取出,使用适量 TBST 溶液清洗。加入封闭液,室温下,置于摇床上缓慢摇动 2 h。移除封闭液,加入以封闭液稀释的 I 抗 (Akt、phospho-Akt (Thr308)、FOXO1、phospho-FOXO1 (Ser256) 和 β -actin 稀释比例 1:1 000)。在 4 $^{\circ}$ C 条件下,置于摇床上,以适当速率孵育过夜。结束后室温条件下 TBST 溶液洗涤 3 次,10 min/次,再以 TBST 溶液按 1:5 000 稀释 II 抗,室温下孵育 1 h,结束后以 TBST 溶液清洗 PVDF 3 次。按 ECL 试剂盒说明书配置 ECL 显色液,凝胶成像仪曝光成像,分析条带灰度并定量分析。

3) qRT-PCR 检测:收集细胞,加入 TRIzol 提取总 RNA。应用 Nano Drop2000 超微量紫外分光光度计,选择核酸 (RNA) 模式。校对后,依次检测各样品 1 μ L。通过 A230、A260 和 A280 值,对 RNA 纯度、浓度进行检测。将 0.1 μ g 总 RNA 加入离心管,70 $^{\circ}$ C 条件下温育 10 min,短暂离心后置于冰上保存。按照反转录试剂盒说明书建立 10 μ L 反应体系,反转录条件如下:42 $^{\circ}$ C,15 min;95 $^{\circ}$ C,5 min,4 $^{\circ}$ C,5 min,-20 $^{\circ}$ C 保存。取上述反应液 2 μ L,2 $\times$ SYBR Green mixture 5 μ L;Forward primer 10 μ mol/L,1 μ L;Reverse primer 10 μ mol/L,1 μ L;Template DNA 1 μ L;Rnase Free water 2 μ L;反应总体积为 10 μ L。反应条件如下:95 $^{\circ}$ C 5 min;95 $^{\circ}$ C 10 s;60 $^{\circ}$ C 30 s;40 cycles。引物序列见表 1。采用溶解曲线分析方法,以 Ct 值为标准,根据公式计算各基因起始模版浓度。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析,计量资料以平均数 $\pm$ 标准误差表示,多组比较用单因素方差分析,进而用最小显著差异法进行两两比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 引物序列

基因	引物	核苷酸序列 5'-3'
β -Actin	Forward primer	CATCCGTAAAGACCTCTATGCCAAC
	Reverse primer	ATGGAGCCACCGATCCACA
Akt	Forward primer	ACTCATTCCAGACCCACGAC
	Reverse primer	CCGGTACACCACGTTCTTCT
FOXO1	Forward primer	CCTACT-TCAAGGATAAGGGCGACA
	Reverse primer	CTGGAT-TGAGCATCCACCAAGA

2 结果

2.1 含药血清细胞毒性观察 24 h 1%、5%、10%、15%、20% 含药血清对 INS-1 正常细胞和 FOXO1 高表达 INS-1 模型细胞均无影响,提示含药血清对细胞无毒性。见表 2。

表 2 12 组细胞存活比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	吸光度 (A)
INS-1 空白对照组	1.18 $\pm$ 0.06
INS-1 + 20% 含药血清	1.04 $\pm$ 0.06
INS-1 + 15% 含药血清	1.06 $\pm$ 0.07
INS-1 + 10% 含药血清	1.09 $\pm$ 0.12
INS-1 + 5% 含药血清	1.09 $\pm$ 0.12
INS-1 + 1% 含药血清	1.01 $\pm$ 0.08
模型空白对照组	1.11 $\pm$ 0.12
模型 + 20% 含药血清	1.02 $\pm$ 0.11
模型 + 15% 含药血清	1.06 $\pm$ 0.11
模型 + 10% 含药血清	1.14 $\pm$ 0.11
模型 + 5% 含药血清	1.09 $\pm$ 0.11
模型 + 1% 含药血清	1.01 $\pm$ 0.06

2.2 不同浓度含药血清对 FOXO1 表达的影响 与空白对照组比较,其他组 FOXO1 蛋白相对表达明显增加,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与模型空白对照组比较,含药血清各组 FOXO1 蛋白相对表达有增加或减少趋势,但差异无统计学意义 ($P > 0.05$),其中 10% 含药血清干预模型细胞所得 FOXO1 相对表达量减少趋势最明显,故选 10% 含药血清做后续通路实验。见图 1。

2.3 含药血清对 PI3K/AKT/FOXO1 通路中相关蛋白及其磷酸化表达的影响 图 2A 是细胞中总 FOXO1、p-FOXO1、Akt 和 p-Akt 的蛋白表达条带,图 2B 是细胞核中 FOXO1、p-FOXO1 蛋白表达条带,图 2C 是细胞质中 FOXO1、p-FOXO1 蛋白表达条带。总蛋白中,FOXO1 经 Dox 干预表达升高,含药血清对其表达影响较小,加入抑制剂使 FOXO1 表达降低,p-FOXO1 经 Dox 干预表达降低,含药血清使其表达升高,抑制剂也会抑制 p-FOXO1 表达。Akt 的表达没有发生变化,而 p-Akt 经 Dox 干预表达降低,含药血清促使其表达升高,抑制剂抑制 p-Akt 的表达。

在胞核和胞质中,Dox 干预使 FOXO1 表达升高,p-FOXO1 表达降低,抑制剂使 FOXO1 和 p-FOXO1 表达均降低,含药血清使 FOXO1 表达降低,p-FOXO1 表达升高。

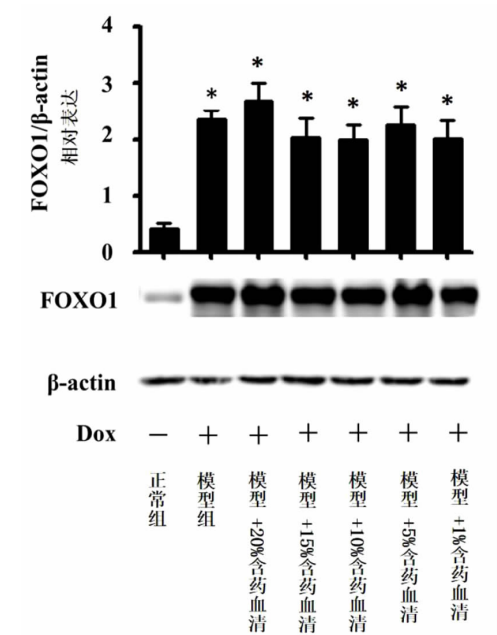


图1 不同浓度含药血清对 FOXO1 蛋白表达的影响
注:与空白对照组比较,* $P<0.05$

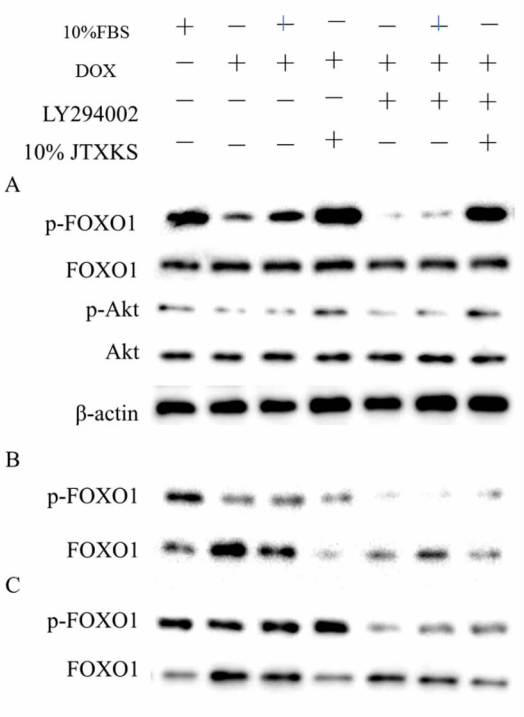


图2 Western blot 法分析蛋白的表达

注:JTXKS:降糖消渴颗粒

2.4 含药血清对 PI3K/AKT/FOXO1 通路中相关基因表达的影响 Akt 基因的相对表达在模型组和 LY294002 抑制剂组中减少,10% 含药血清促进 Akt

的表达;FOXO1 基因的相对表达被 LY294002 抑制剂和 10% 含药血清抑制,与模型组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 3。

3 讨论

FoxO 是 Fox (Forkhead) 的一个亚族,对于细胞分化、凋亡,动物的生长发育、代谢以及炎症反应和免疫等方面有调控作用^[9]。FOXO1 (Forkhead box O1) 又属于 FOXO 亚家族中的一员。已有研究表明,胰岛 B 细胞 FOXO1 的表达很丰富^[10]。在血糖发生和胰岛 B 细胞线粒体代谢障碍过程中 FOXO1 信号传导是中心环节之一^[11-12],经由 PI3K/AKT/FOXO1 途径而影响 B 细胞应激、增殖、凋亡调控网络^[13-14]。

在胰岛素/胰岛素样生长因子-1 (INS/IGF-1) 信号通路中,FOXO1 是关键转录因子之一,受磷酸肌醇-3 激酶/蛋白激酶 B (PI3K/PKB) 磷酸化级联通路的调节。当 PI3K/AKT 途径被激活后,FOXO1 中 3 个保守的 AKT/PKB 蛋白激酶位点被磷酸化,迫使 FOXO1 发生核输出,进而失去转录活性。相反,当胰岛素信号减弱时,通过 PI3K/AKT 通路,AKT/PKB 蛋白激酶活性降低,使 FOXO1 磷酸化水平降低,滞留在细胞核内,通过诱导靶基因表达而导致细胞功能的改变^[15]。可见,FOXO1 的活性受胰岛素的负调节。

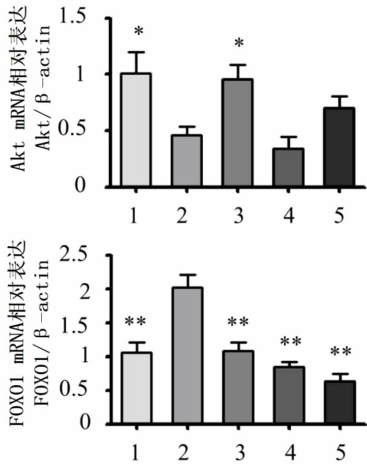


图3 FOXO1 和 AKT 相对基因的表达

注:与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;1. 正常组,2. 模型组,3. 10% JTXK 组,4. LY294002,5. 10% JTXK + LY294002

我们在前期实验中发现,经降糖消渴颗粒含药血清干预后,FOXO1 高表达 INS-1 细胞中,葡萄糖消耗量和胰岛素分泌量均有所增加。但经蛋白质免疫印迹和实时荧光定量 PCR 技术检测,结果显示 FOXO1 总蛋白量和 mRNA 水平均无显著变化,而

FOXO1 蛋白的磷酸化水平却升高明显。这说明降糖消渴颗粒含药血清促进了 FOXO1 高表达 INS-1 细胞中 FOXO1 的磷酸化,造成 FOXO1 核输出,降低了其转录活性。而这很可能是通过激活了 PI3K/AKT 途径,达到保护胰岛 B 细胞的作用^[12]。基于此,我们为进一步证实降糖消渴颗粒是否通过激活 PI3K/AKT/FOXO1 信号通路而发挥作用,本实验对细胞用或不用 PI3K 抑制剂 LY294002 干预后细胞中总 FOXO1、p-FOXO1、Akt、p-Akt 和细胞核内外的 FOXO1、p-FOXO1 的蛋白表达以及 FOXO1、Akt 的 mRNA 含量进行检测。结果表明在总蛋白中,含药血清对 FOXO1 和 Akt 表达影响较少,而磷酸化的表达升高;在胞质和胞核中,含药血清使 FOXO1 的表达降低,磷酸化表达升高,抑制剂 LY294002 使 FOXO1 和 p-FOXO1 表达均降低。在基因检测中发现含药血清使 Akt 表达升高,FOXO1 表达降低,抑制剂使 FOXO1 表达降低,结果与 Western blotting 结果相似。这提示降糖消渴颗粒含药血清可通过 PI3K/AKT/FOXO1 通路促进 FOXO1 磷酸化出核以抑制 FOXO1 核转录,实现保护胰岛 B 细胞的作用。

参考文献

- [1] Worldwide trends in diabetes since 1980; a pooled analysis of 751 population-based studies with 4. 4 million participants [J]. *Lancet*, 2016, 387(10027):1513-1530.
- [2] GBD 2015 Risk Factors Collaborators. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990-2015; a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015 [J]. *Lancet*, 2016, 388(10053):1659-1724.
- [3] Cinti F, Bouchi R, Kim-Muller JY, et al. Evidence of β -Cell Dedifferentiation in Human Type 2 Diabetes [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2016, 101(3):1044-1054.

- [4] Biggelaar LJ, Eussen SJ, Sep SJ, et al. Associations of Dietary Glucose, Fructose, and Sucrose with β -Cell Function, Insulin Sensitivity, and Type 2 Diabetes in the Maastricht Study [J]. *Nutrients*, 2017, 9(4): pii: E380.
- [5] 高思华, 龚燕冰, 倪青, 等. 肝脾肾同治法辨证治疗 2 型糖尿病的临床研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2009, 24(8):1007-1010.
- [6] 莫芳芳, 刘海霞, 华静, 等. 降糖消渴颗粒含药血清对 INS-1 细胞 FoxO1 表达的影响 [J]. *世界中医药*, 2017, 12(12):3046-3049.
- [7] 赵丹丹, 穆倩倩, 方心, 等. 降糖消渴颗粒含药血清对 C2C12 细胞胰岛素抵抗的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2014, 29(5):1577-1579.
- [8] Cao B, Zhang Z, Zhang Y, et al. Effect of Smilax china L. -containing serum on the expression of POLD1 mRNA in human hepatocarcinoma SMMC-7721 cells [J]. *Exp Ther Med*, 2013, 6(4):1070-1076.
- [9] Potente M, Urbich C, Sasaki K, et al. Involvement of Foxo transcription factors in angiogenesis and postnatal neovascularization [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(9):2382-2392.
- [10] Baracho GV, Cato MH, Zhu Z, et al. PDK1 regulates B cell differentiation and homeostasis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(26):9573-9578.
- [11] Folli F, Okada T, Perego C, et al. Altered insulin receptor signalling and β -cell cycle dynamics in type 2 diabetes mellitus [J]. *PLoS One*, 2011, 6(11):e28050.
- [12] Kim-Muller JY, Zhao S, Srivastava S, et al. Metabolic inflexibility impairs insulin secretion and results in MODY-like diabetes in triple FoxO-deficient mice [J]. *Cell Metab*, 2014, 20(4):593-602.
- [13] Liu P, Kao TP, Huang H. CDK1 promotes cell proliferation and survival via phosphorylation and inhibition of FOXO1 transcription factor [J]. *Oncogene*, 2008, 27(34):4733-4744.
- [14] Anuradha R, Saraswati M, Kumar KG, et al. Apoptosis of beta cells in diabetes mellitus [J]. *DNA Cell Biol*, 2014, 33(11):743-748.
- [15] Martinez SC, Cras-Méneur C, Bernal-Mizrachi E, et al. Glucose regulates Foxo1 through insulin receptor signaling in the pancreatic islet beta-cell [J]. *Diabetes*, 2006, 55(6):1581-1591.

(2018-03-09 收稿 责任编辑:杨觉雄)

(上接第 348 页)

- [19] 王素梅, 潘同国, 杨玉梅. 喘息性肺炎患儿外周血 CD137 和 CD28 及 T 细胞亚群的表达研究 [J]. *河北医药*, 2010, 32(19):2678-2679.
- [20] 陈亚儿. 肺炎支原体肺炎患儿外周血共刺激分子 CD137 和 CD28 的表达及临床意义 [J]. *中国初级卫生保健*, 2010, 24(4):96-97.
- [21] 柴少卿. 共刺激分子 CD137 在儿童喘息性肺炎发病机制中的作

用 [D]. 苏州:苏州大学, 2008.

- [22] Hodge G, Hodge S, Reynolds PN, et al. Targeting peripheral blood pro-inflammatory CD28null T cells and natural killer T-like cells by inhibiting CD137 expression: possible relevance to treatment of bronchiolitis obliterans syndrome [J]. *J Heart Lung Transplant*, 2013, 32(11):1081-1089.

(2018-09-29 收稿 责任编辑:芮莉莉)