

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.29.012

乙型肝炎病毒前 S2 蛋白激活人酰基蛋白硫酯酶 1 启动子*

杨 易,刘健翔,李红岩,黄海霞,史云龙,刘永明[△],苏何玲[▲]
(桂林医学院生物化学与分子生物学教研室,广西桂林 541100)

[摘要] **目的** 探讨乙型肝炎病毒(HBV)前 S2 蛋白(preS2)对人酰基蛋白硫酯酶 1(APT1)启动子的作用。**方法** 生物信息学方法确定人 APT1 启动子序列。PCR 扩增人 APT1 启动子和 HBV preS2 基因,分别插入 pGL3 和 pcDNA3.1(-)质粒构建人 APT1 启动子荧光素酶报告基因质粒 pGL3-APT1 和 HBV preS2 真核表达质粒 pcDNA3.1(-)-preS2。将 pGL3-APT1 和 pcDNA3.1(-)-preS2 共转染人肝癌细胞系 HepG2,然后通过检测细胞荧光素酶活性来评价 preS2 对人 APT1 基因启动子的作用。数据用独立样本 *t* 检验分析。**结果** 测序结果证实 pcDNA3.1(-)-preS2 与 pGL3-APT1 与实验设计相符。pGL3-APT1 的荧光素酶活性是阳性对照质粒 pGL3-Control 的荧光素酶活性的 1.2 倍($P < 0.01$)。pcDNA3.1(-)-preS2 与 pGL3-APT1 共转染 HepG2 细胞的荧光素酶活性为无 preS2 基因质粒 pcDNA3.1(-)与 pGL3-APT1 共转染 HepG2 细胞荧光素酶活性的 2.6 倍($P < 0.01$)。**结论** 本研究克隆的人 APT1 启动子序列具有高启动子活性;HBV preS2 可激活人 APT1 启动子。

[关键词] 肝炎病毒,乙型;病毒蛋白类;蛋白质前体;酰基蛋白硫酯酶 1;启动子;反式激活

[中图分类号] R373.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)29-4063-03

Hepatitis B virus preS2 activates human acyl protein thioesterase 1 promoter*

Yang Yi, Liu Jianxiang, Li Hongyan, Huang Haixia, Shi Yunlong, Liu Yongming[△], Su Heling[▲]

(Institution of Biochemistry and Molecular Biology, Guilin Medical University, Guilin, Guangxi 541100, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the trans-regulative effect of hepatitis B virus (HBV) preS2 on the promoter of human acyl protein thioesterase 1 (APT1) gene. **Methods** The promoter sequence of human APT1 gene was identified applying the software of bioinformatics. The APT1 promoter and HBV preS2 gene were amplified with PCR and cloned into pGL3 and pcDNA3.1(-) plasmids to construct the luciferase reporter gene plasmid of human APT1 gene promoter pGL3-APT1 and the preS2 eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1(-)-preS2, respectively. The effect of the preS2 on the human APT1 gene promoter was examined by cotransfecting hepatocellular carcinoma cell HepG2 with pGL3-APT1 and pcDNA3.1(-)-preS2 and measuring luciferase activities of the HepG2 cells. The statistical data were analyzed with independent-samples *t* test. **Results** Both plasmids of pGL3-APT1 and pcDNA3.1(-)-preS2 were confirmed by DNA sequencing to be accurately constructed as design. The luciferase activity of the pGL3-APT1 was 1.2 times ($P < 0.01$) that of the positive control plasmid pGL3-Control. And the luciferase activity of the HepG2 cells cotransfected with pcDNA3.1(-)-preS2 and pGL3-APT1 was 2.6 times ($P < 0.01$) that of the HepG2 cells cotransfected with the plasmid without preS2 gene pcDNA3.1(-) and pGL3-APT1. **Conclusion** The human APT1 promoter cloned in the study has high promoter activity; HBV preS2 activates human APT1 promoter.

[Key words] hepatitis B, rivus; viral proteins; protein precursors; acyl protein thioesterase 1; promoter; transactivation

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是全球性公共卫生问题,慢性 HBV 感染人群超过 2.4 亿,每年约有 78 万人死于因 HBV 感染所导致的相关疾病^[1]。大量的研究表明,HBV 编码的多种蛋白具有反式转录激活功能。这些病毒反式调节因子在 HBV 感染所致的炎症反应乃至肝细胞癌发生的过程中发挥着关键的作用^[2-3]。HBV 前 S2 蛋白(preS2)是重要的 HBV 反式调节因子,可调节原癌基因、端粒酶及一氧化氮合酶等基因的表达,其反式转录激活作用影响宿主细胞生长、信号转导、免疫调节和肿瘤发生等生理、病理过程^[4-5]。近年来,酰基蛋白硫酯酶 1(acyl protein thioesterase 1, APT1)因其参与蛋白质棕榈酰化修饰的调节而受到重视。棕榈酰化修饰是蛋白质完成翻译后脂质共价修饰的一种重要形式,广泛存在于生物体内,在代谢、凋亡、细胞内信号的传导以及疾病的发生发展等环节中都起着非常重要的作用^[6-8]。蛋白质棕榈酰化

修饰的主要类型是 S 型棕榈酰化修饰,即 16 个碳的饱和棕榈酸盐以硫酯键形式共价结合到半胱氨酸残基的巯基上。APT1 是棕榈酰化蛋白去 S 型棕榈酰化修饰的主要水解酶,在蛋白质可逆性棕榈酰化修饰中发挥关键作用^[9]。目前尚不清楚 preS2 对 APT1 基因表达的影响。本研究构建 APT1 启动子荧光素酶报告质粒和 HBV 的 preS2 真核表达质粒共转染人肝癌细胞系 HepG2,以观察 preS2 对 APT1 启动子的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料 乙型肝炎患者血清及全血由广西壮族自治区桂林市第三人民医院提供。HepG2 细胞由解放军 302 医院馈赠,高糖 DMEM 培养基、链霉素及青霉素及胰酶均购自美国 Gibco 公司,胎牛血清购自浙江天杭生物科技有限公司, Lipofectamine™ 2000 转染试剂购自美国 Invitrogen 公司,限制性内切酶 EcoR I、BamH I、KpnI 及 XhoI 购自上海生物工程有

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81460320);广西自然科学基金资助项目(2013GXNSFAA019233);广西壮族自治区研究生教育创新计划资助项目(YCSZ2014205);广西高等学校优秀中青年骨干教师培养工程资助成果。 作者简介:杨易(1988-),在读硕士,主要从事分子病理学研究。 △ 通讯作者, Tel:13737700363; E-mail:liuyym@glmc.edu.cn; ▲ 通讯作者, Tel:13978348621; E-mail:helingsu@glmc.edu.cn。

限公司, 荧光素酶报告基因质粒 pGL3 系列载体和 T-easy 试剂盒购自美国 Promega 公司, 质粒 DNA 小量提取试剂盒购自天根生化科技有限公司, 双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自北京威格拉斯生物技术有限公司。测序均由上海生物工程有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 pcDNA3.1(-)-preS2 重组质粒的构建 根据 HBV 基因组全序列 (GenBank accession No. AF384371), 设计引物扩增 preS2 基因, 引物两端分别加上 EcoR I 和 BamH I 酶切位点序列, 上游引物为: 5'-GAA TTC CAA TGC AGT GGA ACT CCA CC-3', 下游引物为: 5'-GGA TCC GTT CGG TGC AGG GTC-3'。提取乙型肝炎患者血清中的 HBV 为模板, PCR 扩增条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。将 PCR 产物克隆入 pGEM[®]-T Easy 载体, EcoR I 和 BamH I 双酶切后装入 pcDNA3.1(-) 载体中构建 pcDNA3.1(-)-preS2 重组质粒, 并测序鉴定其序列。

1.2.2 APT1 启动子双荧光素酶报告基因质粒的构建 在 <http://dbtss.hgc.jp/> 数据库中查寻 APT1 基因 (GenBank accession No. NM_006330) 转录起始位点, 选取转录起始点上游 1 500 bp 核苷酸及转录起始点下游 100 bp 核苷酸序列, 以 Berkeley Drosophila Genome Project (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html) 数据库在线预测其启动子, 根据软件预测的分值及与转录起始点的相对位置, 设计引物扩增 -1 164~+67 bp 的片段, 并在引物的两端加上 KpnI 和 XhoI 酶切位点, APT1 上游引物为: 5'-GGG GTA CCC ACC GTG TTA AGG CAG GAT G-3', APT1 下游引物为: 5'-CCG CTC GAG CCC CGC GCT ACC TTC CG CGC-3'。以人外周血中的 DNA 为模板, PCR 反应条件为: 94 °C 3 min; 94 °C 40 s, 58 °C 30 s, 72 °C 1 min 30 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 5 min。将扩增的 APT1 启动子序列克隆入 pGL3 质粒中构建 pGL3-APT1 启动子双荧光素酶报告基因质粒。

1.2.3 细胞培养、转染及荧光素酶活性检测 以含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基, 37 °C、5% CO₂ 培养 HepG2 细胞, 转染前 1 d 以细胞 2×10⁵ 个/孔接种于 24 孔板。以 Lipofectamine[™] 2000 为转染试剂, 将无内毒素质粒转染至细胞中, 所有转染均同时转染海肾荧光素酶报告基因质粒 pRL-TK 作为内参照, 以校正荧光。转染 48 h 后, 按双荧光素酶报告基因检测试剂盒说明书裂解细胞、检测荧光。

1.2.4 pGL3-APT1 启动子活性检测 设立空白对照 (即未转染组), 分别将无启动子质粒 pGL3-Basic、阳性启动子质粒 pGL3-Control 及 APT1 启动子质粒 pGL3-APT1 转染至 HepG2 细胞, 转染 48 h 后, 裂解细胞、检测荧光, 以测定所构建的 pGL3-APT1 启动子双荧光素酶报告基因质粒中 APT1 基因启动子的活性。

1.2.5 preS2 与 APT1 基因启动子的相互作用检测 以 pcDNA3.1(-) 与 pGL3-Basic Vector 共转染组, pcDNA3.1(-) 与 pGL3-Control Vector 共转染组, pcDNA3.1(-) 与 pGL3-APT1 共转染组为对照, pcDNA3.1(-)-preS2 与 pGL3-APT1 共转染组为实验组, 转染 HepG2 细胞并检测报告荧光, 以检测前 S2 蛋白对 APT1 基因启动子的作用。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 独立样本 *t* 检验分析, 以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 pcDNA3.1(-)-preS2 重组质粒的构建 用 PreS2 基因引物扩增出的 DNA 片段大小与预期相符, 将其克隆入 pcDNA3.1(-) 载体中构建 pcDNA3.1(-)-preS2 重组质粒, 测序结果证实重组质粒构建与实验设计相符。

2.2 APT1 启动子双荧光素酶报告基因质粒的构建 Berkeley Drosophila Genome Project 数据库在线预测提示在 APT1 基因的 -1 303~-1 247 bp、-888~-837 bp、-93~-43 bp、-4~+47 bp 及 +39~+89 bp 出现了 5 个可能的启动子序列, 其分值分别为: 0.69、0.96、0.68、0.63、0.63。根据软件预测的分值及与转录起始点的相对位置, 选取包括 -888~-837 bp、-93~-43 bp 及 -4~+47 bp 的序列在内的一段 APT1 基因序列作为其启动子。设计引物扩增 -1 164~+67 bp 的片段, 所设计的 APT1 启动子引物扩增出的 DNA 片段大小与预期相符, 将其克隆入 pGL3 启动子双荧光素酶报告基因质粒, 将获得的重组质粒 pGL3-APT1 送上海生物工程公司测序, 其结果证实重组质粒构建与实验设计相符。

2.3 pGL3-APT1 启动子活性检测 荧光素酶活性检测提示, 阴性对照 pGL3-Basic Vector 组无荧光素酶表达, 细胞裂解液中荧光素酶的活性接近空白对照; 阳性对照 pGL3-Control 组正常表达荧光素酶, 其荧光素酶的活性为 pGL3-Basic 组的 5.1 倍; pGL3-APT1 组正常表达荧光素酶, 其荧光素酶的活性为 pGL3-Basic 组 6.1 倍; 略高于 pGL3-Control 组, 表明 pGL3-APT1 中 APT1 的启动子具较强的启动子活性, 见图 1。

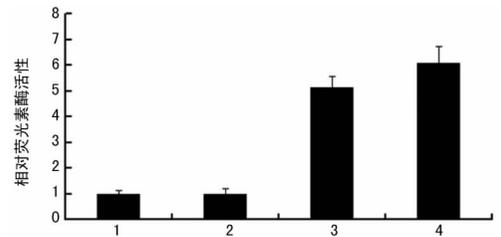


图 1 pGL3-APT1 启动子活性检测结果

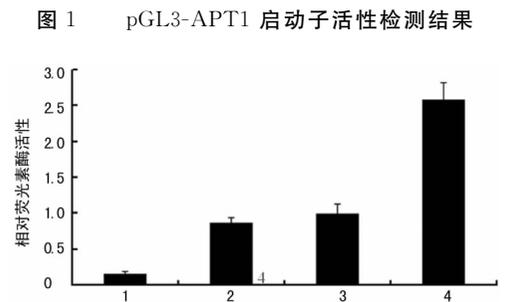


图 2 HBV PreS2 与 APT1 基因的启动子的相互作用检测结果

2.4 HBV PreS2 与 APT1 基因的启动子的相互作用检测 荧光素酶活性检测提示, pcDNA3.1(-)-preS2 与 pGL3-APT1 共转染实验组、pcDNA3.1(-) 与 pGL3-APT1 共转染对照组、pcDNA3.1(-) 与 pGL3-Control Vector 共转染对照组均有荧光素酶表达, 而 pcDNA3.1(-) 与 pGL3-Basic Vector 共转染对照组无荧光素酶表达。其中 pcDNA3.1(-)-preS2

与 pGL3 - APT1 共转染实验组荧光素酶活性最高,为 pcDNA3.1(-) 与 pGL3-APT1 共转染对照组的 2.6 倍,显示 preS2 激活 APT1 启动子,见图 2。

3 讨 论

由于 HBV 是具有泛嗜性感染的病毒,其感染的受累器官并不限于肝脏。因此,尽管 preS2 的反式调节作用已有大量的报道,但其对人体多种细胞、许多基因的作用以及由此产生的细胞生理病理变化仍待研究。

有研究指出,preS2 激活一种具有磷脂酰基转移酶结构域的蛋白,即 preS2 反式激活蛋白 1 的基因^[10],提示其可能参与细胞的磷脂代谢,影响细胞的磷脂信号分子水平。本研究的前期工作克隆了人亲磷脂酸磷脂酶 A1(phosphatidic acid-prefering phospholipase A1,PA-PLA1)2 种亚型基因(GenBank accession no. DQ315474 和 GU376468)。PA-PLA1 在细胞内对磷脂酸进行水解,生成溶血磷脂酸。对小鼠分泌胰岛素细胞株 MIN6 行不同浓度和不同时间的葡萄糖刺激胰岛素分泌实验,结果显示 MIN6 细胞 PA-PLA1 基因的表达与胰岛素分泌呈正相关^[11],沉默 PA-PLA1 基因可致胰岛素分泌降低^[12]。此外,preS2 可作用于胰岛素受体基因而下调胰岛素受体基因的表达^[13]。这些研究结果提示,preS2 可能在乙型肝炎并发糖尿病的发病、发展中发挥作用。

本研究观察 preS2 对人 APT1 启动子的作用。APT1 是具有硫酸酯酶活性和磷脂酶活性的酶,因而也被称为 APT1/溶血磷脂酶 A1。APT1 主要定位于细胞质,能对多种细胞生物学过程发挥重要的调节作用。一方面,APT1 通过其硫酸酯酶活性参与蛋白质棕榈酰化修饰的调节。蛋白质棕榈酰化修饰是一个可逆的过程,由蛋白质酰基转移酶和硫酸酯酶双重调控。蛋白质酰基转移酶使蛋白质棕榈酰化,导致蛋白质的疏水性增加,在蛋白质的稳定、转运和定位过程中起到重要作用,同时使蛋白质的生理功能多样化^[14]。而硫酸酯酶中 APT1 水解棕榈酰基使 S 型棕榈酰化蛋白去棕榈酰化修饰。另一方面,APT1 还通过其磷脂酶活性调节溶血磷脂水平。溶血磷脂是活跃的脂类信号分子,可通过其特异的 G 蛋白耦联受体,在血小板激活、胰岛素分泌、细胞增殖以及肌动蛋白细胞骨架的重构等细胞过程中发挥关键调节作用^[15-17]。目前还不清楚 preS2 对 APT1 基因的作用以及由此产生的对包括胰岛素分泌在内的细胞生理生化过程的影响。因此,探讨 preS2 对 APT1 启动子的作用,明确 preS2 对 APT1 基因表达的影响,将有助于阐明 HBV 感染导致的疾病发生、发展的分子机制。

应用生物信息学方法预测、分子克隆技术获得的人 APT1 启动子经启动子活性检测显示其活性与阳性对照启动子活性相同,甚至略高。这一结果表明本研究所克隆的人启动子序列具有很强的启动子活性。目前鲜有人 APT1 启动子功能的研究报道,该 APT1 启动子的克隆将为深入研究 APT1 在细胞的诸多生理和病理过程中的作用奠定实验基础。

HBV preS2 真核表达质粒和人 APT1 启动子荧光素酶报告基因质粒共转染 HepG2 细胞的实验结果表明,preS2 可激活人 APT1 启动子,因而提示 preS2 可上调 APT1 基因的表达。鉴于 APT1 参与机体多种细胞生物学过程,preS2 对 APT1 启动子的激活作用意味着该病毒蛋白通过增加 APT1 的表达水平而对机体产生复杂的生理和病理影响。

综上所述,本研究克隆的人 APT1 启动子序列具有较强的启动子活性,preS2 可激活 APT1 启动子。这些研究结果不仅有助于深入研究 APT1 在细胞的诸多生理和病理过程中的作

用,而且有助于阐明 HBV 感染导致的疾病发生、发展的分子机制。

参考文献

- [1] World Health Organization. Hepatitis B fact sheet[EB/OL]. [2014-07-28] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/index.html>.
- [2] Li CH, Xu F, Chow S, et al. Hepatitis B virus X protein promotes hepatocellular carcinoma transformation through interleukin-6 activation of microRNA-21 expression[J]. *Eur J Cancer*, 2014, 50(15):2560-2569.
- [3] Lun YZ, Cheng J, Chi Q, et al. Transactivation of proto-oncogene c-Myc by hepatitis B virus transactivator MH-Bst167[J]. *Oncol Lett*, 2014, 8(2):803-808.
- [4] Zhang X, Gao L, Liang X, et al. HBV preS2 transactivates FOXP3 expression in malignant hepatocytes[J]. *Liver Int*, 2015, 35(3):1087-1094.
- [5] Ni Y, Sonnabend J, Seitz S, et al. The pre-S2 domain of the hepatitis B virus is dispensable for infectivity but serves a spacer function for L-protein-connected cirrus assembly[J]. *J Virology*, 2010, 84(8):3879-3888.
- [6] Kemp LE, Rusch M, Adibekian A, et al. Characterization of a serine hydrolase targeted by acyl-protein thioesterase inhibitors in *Toxoplasma gondii*[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(38):27002-27018.
- [7] Kong E, Peng S, Chandra G, et al. Dynamic Palmitoylation links cytosol-membrane shuttling of acyl-protein thioesterase-1 and acyl-protein thioesterase-2 with that of proto-oncogene h-ras product and growth-associated protein-43[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(13):9112-9125.
- [8] Satou M, Nishi Y, Yoh J, et al. Identification and characterization of acyl-protein thioesterase 1/lysophospholipase I as a ghrelin deacylation/lysophospholipid hydrolyzing enzyme in fetal bovine serum and conditioned medium[J]. *Endocrinology*, 2010, 151(10):4765-4775.
- [9] Tian L, McClafferty H, Knaus HG, et al. Distinct acyl protein transferases and thioesterases control surface expression of calcium-activated potassium channels[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(18):14718-14725.
- [10] 纪冬, 刘妍, 韩萍, 等. 乙型肝炎病毒前-S2 蛋白反式激活蛋白 1 基因的克隆化研究[J]. *军医进修学院学报*, 2010, 31(1):55-57.
- [11] 于婕, 苏何玲, 莫之婧, 等. MIN6 细胞中亲磷脂酰基转移酶 A1 基因表达与胰岛素分泌关系的初步研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2011, 21(21):2576-2580.
- [12] 莫之婧, 苏何玲, 朱华, 等. 亲磷脂酰基转移酶 A1 基因沉默降低 MIN6 细胞胰岛素分泌水平[J]. *实用医学杂志*, 2014, 30(18):2872-2875.
- [13] 苏何玲, 纪冬, 韩萍, 等. HBV 前 S2 蛋白对胰岛素受体基因下调作用的研究[J]. *解放军医学杂志*, 2009, 34(6):667-669.
- [14] Wetzel J, Herrmann S, Swapna LS, et al. The role of palmitoylation for protein recruitment to the inner membrane complex of the malaria parasite(下转第 4069 页)

细胞 TGF- β 分泌量增加的同时, IFN- γ 分泌量降低, 且呈量效依赖关系, 随着 LPS 干预浓度的增加(0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 上述干预作用开始下降, 当刺激浓度达到 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 则呈相反作用, 也就是说 TGF- β 分泌量下降而 IFN- γ 分泌量开始升高; 本研究也发现 TGF- β 的分泌量跟 LPS 的干预浓度有关, 而且跟 LPS 的干预时间也有关系, 干预时间为 24 h 内(包括 24 h)时, TGF- β 的分泌量达到最大有一个最佳的 LPS 干预浓度, 而在干预时间为 30 h 时, TGF- β 的分泌量反而出现下降趋势; 而且还有人认为 TGF- β 缺乏的小鼠在生存的 3 周内就会发生全身炎症反应, 而且这种炎症反应和小肠上皮细胞功能紊乱有关^[15]; 目前, 多数学者认为, 肝脏的缺血再灌注损伤的核心仍然是炎症反应, 主要由炎症细胞介导。ICAM-1 通过与其配体 LFA-1 结合, 启动细胞黏附和活化, 使中性粒细胞牢固地黏附于血管壁; 还有研究显示 ICAM-1 可以介导中性粒细胞通过内皮细胞全层, 迁移至肝实质细胞, 释放蛋白酶和反应性氧原子, 造成肝细胞损伤^[16]; 而在气道上皮细胞中对 ICAM 炎症因子家族的研究相对较少, 而本研究对 ICAM-1 和 ICAM-2 同时做了研究, 发现 LPS 能够干预气道上皮细胞分泌 ICAM-1 和 ICAM-2, 在 LPS 干预浓度为 20.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 干预时间为 4, 8 h 时, ICAM-1 的分泌量可以达到峰值, 而且在各个时相点, ICAM-1 的分泌量均增加, 且存在一个最佳的 LPS 干预浓度; 而 ICAM-2 在除干预时间为 30 h 以外的各时相点才和 ICAM-1 分泌量的变化表现一致。

本研究通过不同浓度的 LPS 在不同时相点干预 A549 细胞, 并分析炎症因子 TGF- β 、TNF- α 、MCP-1、ICAM-1 和 ICAM-2 分泌量的变化, 发现 LPS 可以对气道上皮细胞 TGF- β 、MCP-1、TNF- α 、ICAM-1 和 ICAM-2 的分泌量产生影响, 而且上述炎症因子分泌量和 LPS 的干预浓度及干预时间有关, 这就说明气道炎症性疾病的发生与各种损伤性刺激的强度和um时间密切相关, 而且他还提示在疾病发生的合适时机对疾病进行干预可能会起到更好的治疗作用。

参考文献

- Peter RM, Robert JD, Jagdish LD. Airway epithelial cells, cytokines, and pollutants[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1999, 160(5):38-43.
- Hamel AL, Lin LL, Nayar GP. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs[J]. *J Virol*, 1998, 72: 5262-5267.
- Moustakas A, Pardali K, Gaal A, et al. Mechanisms of TGF- β signaling in regulation of cell growth and differentiation[J]. *Immunol Lett*, 2002, 82(1/2):85-91.
- 李玉梅, 卫红昌. ALI /ARDS 抗炎治疗研究的策略与展望[J]. *中国病理生理杂志*, 2009, 25(4):813-816, 825.
- 曾春芳, 吴亚梅. ICAM-1 在慢性阻塞性肺疾病大鼠气道炎症中的作用[J]. *泸州医学院学报*, 2004, 27(3):212-215.
- Liu AH. Something old, something new: indoor endotoxin, allergens and asthma[J]. *Paediatr Respir Rev*, 2004, 5 Suppl A:S65-71.
- Barnes PJ. Transcription factors in airway diseases[J]. *Lab Invest*, 2006, 86(9):867-872.
- Werling D, Hope JC, Howard CJ, et al. Differential production of cytokines reactive oxygen and nitrogen by bovine macrophages and dendritic cells stimulated with Toll-like receptor agonists[J]. *Immunol*, 2004, 111:41-52.
- Muller-Decker K, Manegold G, Butz H, et al. Inhibition of cell proliferation by bacterial lipopolysaccharides in TLR4-positive epithelial cells: independence of nitric oxide and cytokine release[J]. *J Invest Dermatol*, 2005, 124: 553-561.
- Tralau-Stewart CJ, Williamson RA, Nials AT, et al. GSK 256066, an exceptionally high-affinity and selective inhibitor of phosphodiesterase 4 suitable for administration by inhalation: in vitro, kinetic, and in vivo characterization[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2011, 337(1):145-154.
- Barnes PJ. Alveolar macrophages as orchestrators of COPD[J]. *COPD*, 2004, 1(1):59-70.
- 牟海波, 林茂芳, 岑洪, 等. 转化生长因子 $\beta 1$ 抑制树突状细胞的成熟及下调 TLR4 的表达[J]. *中国病理生理杂志*, 2005, 21(8):1476-1479.
- Yun KJ, Koh DJ, Kim SH, et al. Anti-inflammatory effects of synaptic acid through the suppression of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2, and proinflammatory cytokine expressions via nuclear factor kappaB inactivation[J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(21):10265-10272.
- 万力, 李凤玉, 闫永宏, 等. 脂多糖对正常人皮肤成纤维细胞增殖及转化生长因子- $\beta 1$ 、 γ -干扰素分泌的诱导作用[J]. *华北国防医药*, 2009, 21(2):6-9.
- Ropeleski MJ, Tang J, Walsh-Reitz MM, et al. Interleukin-11-induced heat shock protein 25 confers intestinal epithelial-specific cytoprotection from oxidant stress[J]. *Gastroenterology*, 2003, 124:1358-1368.
- 张宝良, 刘彤, 朱理玮, 等. 实验性大鼠原位肝移植供肝热缺血损伤研究[J]. *天津医科大学学报*, 2006, 12(1):8-10.
- (收稿日期:2015-04-17 修回日期:2015-05-21)
- orphan G-protein-coupled receptor[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 326(4):744-751.
- Rancoule C, Attané C, Grès S, et al. Lysophosphatidic acid impairs glucose homeostasis and inhibits insulin secretion in high-fat diet obese mice[J]. *Diabetologia*, 2013, 56(6): 1394-1402.
- (收稿日期:2015-04-15 修回日期:2015-05-16)

(上接第 4065 页)

[J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(3):1712-1728.

[15] Bolen AL, Naren AP, Yarlagadda S, et al. The phospholipase A1 activity of lysophospholipase A- I links platelet activation to LPA production during blood coagulation[J]. *J Lipid Res*, 2011, 52(5):958-970.

[16] Soga T, Ohishi T, Matsui T, et al. Lysophosphatidylcholine enhances glucose-dependent insulin secretion via an