

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.27.007

基于凝血酶合并缺氧诱导 PC12 细胞损伤的模型研究*

覃弘宇,李 银,李定祥,邓奕辉[△](湖南中医药大学中西医结合心脑血管疾病防治湖南省重点实验室/细胞生物学与分子技术
湖南省高校重点实验室,长沙 410208)

[摘要] **目的** 探索凝血酶合并缺氧对 PC12 细胞损伤的最佳反应时间点,为进一步研究凝血酶在缺血性脑损伤中的意义提供实验方法。**方法** 建立体外缺氧合并凝血酶诱导的 PC12 细胞损伤模型。按照常规细胞培养方法,采用三气培养箱(1%O₂, 5%CO₂, 94%N₂)和无糖 DMEM 培养液造成细胞缺氧模拟缺血,并同时加入不同浓度的凝血酶(0、50、100、150 和 200 U/mL),再将每组都作用于 1、6、12、24 h 后,采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)分析细胞的存活率、TUNEL 法检测细胞的凋亡程度。**结果** 随着缺氧时间的延长和凝血酶浓度的增加,细胞存活率逐渐下降,TUNEL 细胞阳性率和凋亡率逐渐升高。低浓度凝血酶(50 U/mL)在缺氧 1 h 后,与对照组(0 U/mL)相比细胞存活率有所升高,提示低凝血酶可能有保护作用。尤以缺氧 12 h 后开始细胞损伤更为明显,150 U/mL 凝血酶组作用 12 h 后与对照组相比细胞存活率显著下降($P<0.01$),凋亡率显著增加($P<0.05$);且 200 U/mL 凝血酶作用 12 h 和 150、200 U/mL 凝血酶组作用 24 h 后细胞存活率与对照组比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 150 U/mL 凝血酶在缺氧作用 12 h 后为研究凝血酶合并缺氧对 PC12 细胞损伤的最佳模型条件。

[关键词] PC12 细胞;凝血酶;缺氧;细胞损伤**[中图分类号]** R743.3**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)27-3766-04

Model of PC12 cell injury induced by thrombin combined with hypoxia*

Qin Hongyu, Li Yin, Li Dingxiang, Deng Yihui[△]

(Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine for Prevention and Treatment of Cardiac and Cerebral of Hunan Traditional Chinese Medicine University/Key Laboratory of Cell Biology and Molecular Technology of Universities and Colleges of Hunan Province, Changsha, Hunan 410208, China)

[Abstract] **Objective** To explore the optimal reaction time of thrombin combined with hypoxia on PC12 cell injury, and to provide experimental method for the study of the significance of thrombin in ischemic brain injury. **Methods** the PC12 cell injury model induced by hypoxia in vitro was established. In the conventional cell culture method, three 1%O₂ (5%CO₂, 6 h, 94%N₂) and DMEM (24 h) cells were used to simulate ischemia, and four (50, 150 and 200 U/ml) were added to the different concentrations of thrombin (0, 100, and 12 h). Cell survival rate was detected by MTT and apoptosis rate of cell was detected by TUNEL. **Results** the survival rate of the cells decreased, the positive rate and apoptosis rate of TUNEL cells increased gradually with the increase of time and the concentration of thrombin. Low concentrations of thrombin (50 U/mL) in hypoxia 1H, compared with the control group (0 U/mL), the survival rate increased, suggesting that low thrombin may have protective effect. The cell viability was significantly decreased ($P<0.01$), and the apoptosis rate was significantly increased ($P<0.05$), and the difference was statistically significant ($P<0.05$) between 200 U/mL and control group (U/mL) after 12 h was significantly decreased (12 h). **Conclusion** Thrombin combined with hypoxia in different time can cause cell damage, with the increase of time and thrombin concentration, the damage of cells increased gradually, the MTT and TUNEL cells apoptosis, the minimum dose of thrombin induced damage to PC12 cells, 150 U/mL thrombin in the role of 12 h cells after the damage and compared with the control group, it has significant statistical significance, therefore, the optimal model for the damage of PC12 cells after 150 U/mL was selected.

[Key words] PC12 cells; thrombin; anoxia; cell injury

急性缺血性卒中 (acute ischemic stroke, AIS) 是最常见脑卒中疾病之一,占各类脑卒中(stroke)的 60%~80%^[1]。因血液循环障碍,如缺血、缺氧等所致的局限性脑组织的缺血性坏死和软化,所以该病具有发病急、治疗时间窗短、致残率及复发率高等特点^[2]。AIS 的基本病理过程是脑血管阻塞和随之发生的脑细胞损伤,其发生机制的学说主要有能量耗竭、兴奋性氨基酸毒性、梗死灶周边半暗带去极化、炎症细胞因子、钙离子

超载、一氧化氮(NO)和自由基损伤、细胞凋亡等^[3-6]。近年来,凝血酶在 AIS 发生发展中的作用受到了学术界的重视^[7-8],以凝血酶作为药理作用靶点来研究 AIS 具有重要价值;脑缺血的模型报道有很多,为模拟机体内急性缺血的损伤机制,通常以建立体外的脑缺血细胞模型来模拟缺血性脑损伤;而因 PC12 细胞神经细胞生长因子(nerve growth factor, NGF)刺激诱导后可以向交感神经元分化,而具有神经元功能^[9];故本

* 基金项目:湖南省自然科学基金资助项目(13JJ6061, 14JJ2113);湖南省中医药科研基金资助项目(201319);湖南省教育厅资助项目(12A105);湖南省重点学科中西医结合基础资助项目;湖南省自然科学基金创新群体基金资助项目;湖南省高校科技创新团队资助。作者简介:覃弘宇(1990—),在读硕士,主要从事中西医结合防治糖尿病血管并发症研究。 [△] 通讯作者, E-mail: 644138330@qq.com。

实验利用 PC12 细胞在凝血酶合并缺氧的环境下模拟脑缺血后神经细胞,观察不同凝血酶浓度对细胞损伤的情况,探索其损伤的最佳时间点,从而为研究脑缺血合并凝血酶细胞损伤的机制和药物防治提供实验方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 胰蛋白酶(Sango 公司),DMEM HIGH GLUCOSE(1X)培养基(美国 HyClone 试剂公司,批号 NAC1362);链霉素青霉素混合溶液(100 U/mL 青霉素、100 g/L 链霉素)、磷酸盐缓冲液(PBS,pH7.2)均购自 Gibco 公司;胎牛血清(美国 HyClone 试剂公司,批号 NWK0489);凝血酶(中国 Solarbio 试剂公司 批号 106A069);二甲基亚砜(DMSO,美国 MP Bio-medicals,批号 196055);噻唑蓝(3-4,5-dimethyl-2-thiazoly-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide,MTT,中国 Solarbio 公司,批号 M8181)。TUNEL 试剂盒(瑞士 Roche 试剂公司,批号 11684817910)。

1.1.2 细胞 PC12 细胞,来源于大鼠的肾上腺嗜铬细胞瘤细胞(高分化,永生性),购自长沙赢润生物技术有限公司,编号 2015032007。

1.1.3 主要仪器 倒置显微镜(重庆,型号:XDS-1B),普通二氧化碳培养箱(德国贺利氏,Heracell),三气培养箱(Thermo,3131),SP-756 型紫外分光光度计(上海光谱,ZW0907060805),酶标仪(美国,ELX800)。

1.2 实验方法

1.2.1 PC12 细胞的培养及缺氧合并凝血酶损伤模型的建立 PC12细胞以含 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 g/L 链霉素的 DMEM 高糖培养基于 37 °C、5%CO₂ 及饱和湿度下的培养箱中培养,2 d 换液一次,待细胞成长融合后传代培养。细胞以 1×10⁵ 个/mL 接种于 96 孔培养板,每孔 0.18 mL,培养 24 h 待细胞贴壁后再加终浓度为 50 μg/L 的神经生长因子(NGF)诱导分化并继续培养 72 h 后^[5],吸弃原培养液;将细胞随机分为 5 组,分别为 0 U/mL 凝血酶组(对照组)、50 U/mL 凝血酶组,100 U/mL 凝血酶组,150 U/mL 凝血酶组和 200 U/mL 凝血酶组。每组设 8 个复孔,分别加入 0、50、100、150、200 U/mL 浓度的凝血酶 10 μL 和 100 μL 无血清培养基,置于三气培养箱中(5%CO₂,1%O₂,94%N₂)培养模拟缺氧缺血过程。不同浓度凝血酶组按 1、6、12、24 h 时间点依次培养孵育后取出。制备不同浓度(0、50、100、150、200 U/mL)不同时间点(1、6、12、24 h)缺氧合并凝血酶损伤模型。

1.2.2 指标检测

1.2.2.1 细胞生存率测定[四甲基偶氮唑蓝(MTT 法)] 分别取上述不同时间点处理的细胞检测,加 10 μL 5 mg/mL 的

MTT 于培养箱中培养 4 h 后,吸去上清液加 150 μL 的 DM-SO,振荡 10 min 后于 490 nm 波长处检测吸光度值(A)。A 值越大,表明细胞存活率越高,细胞损伤越小。

1.2.2.2 细胞凋亡率检测(TUNEL 检测) 细胞固定爬片后,去掉孔板中的培养基加入固定液固定后,吸弃固定液加破膜工作液覆盖爬片,常温下孵育 10 min,取 TUNEL 试剂盒内适量试剂 1(TdT)和试剂 2(dUTP)按 1:9 混合,用锡纸包住平放于水浴锅内,滴加适量 DAPI 染液到爬片上,室温避光孵育 5 min,在荧光显微镜下观察拍照。

1.3 统计学处理 数据均用 SPSS 17.0 进行统计,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间均数比较用单因素方差分析;组间两两比较方差齐者用 LSD 检验,方差不齐者用非参数检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NGF 诱导前后 PC12 细胞形态的变化 初次复苏 PC12 细胞在培养基中呈悬浮状态,胞体圆形,处于游离期细胞贴壁能力较差,易聚集成团,呈半悬浮状态;培养 24 h 后细胞开始贴壁生长并分裂增殖,吸附期 PC12 细胞在培养基中多呈椭圆或多角形,倾向于聚集成团簇状;培养约 72 h 后,细胞进入对数生长期,此时细胞快速生长和分裂,细胞折光性强,数目明显增多。NGF 诱导 PC12 细胞转化神经元样细胞的培养后,随培养时间延长,细胞数量无明显增加,细胞长出突触增粗增长,贴壁牢固;培养 7 d 后基本无法消化传代;培养 10 d 后细胞进入衰退期。形态学观察培养 24 h 可见细胞长出较短、较细的突触;48 h 突触数量及长度增加;72 h 突触长度可达胞体的 4~5 倍,交织成网状,呈典型的神经元形态,占总数 96% 以上。

2.2 细胞存活率变化 随着时间的缺氧时间的延长和凝血酶浓度的增加,细胞存活率逐渐下降。50 U/mL 凝血酶组在缺氧 1 h 后,与对照组相比细胞存活率有所升高,提示低凝血酶可能有保护作用。随着时间的延长,细胞存活率逐渐下降(图 1),1、6、12、24 h 均出现不同程度的细胞损伤,尤以缺氧 12 h 后细胞损伤更为明显,150、200 U/mL 凝血酶组作用 12 h 后与对照组相比细胞存活率显著下降($P < 0.01$)。见表 1。

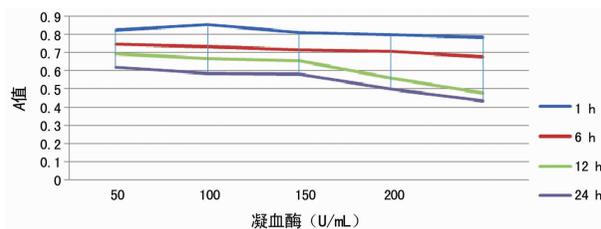


图 1 各时间不同浓度凝血酶的作用

表 1 不同凝血酶浓度在不同作用时间点 PC12 细胞存活率比较($\bar{x} \pm s, A$ 值)

组别	1 h	6 h	12 h	24 h
对照组	0.821 7±0.022 3	0.745 6±0.021 0	0.691 3±0.017 8	0.617 9±0.016 4
50 U/mL 凝血酶组	0.851 7±0.021 2	0.731 2±0.020 9	0.663 9±0.016 5	0.583 9±0.015 5
100 U/mL 凝血酶组	0.809 1±0.020 8	0.715 6±0.019 8	0.654 4±0.016 1	0.577 1±0.014 5
150 U/mL 凝血酶组	0.796 8±0.019 9	0.707 4±0.019 8	0.557 3±0.015 6 ^b	0.498 0±0.012 3 ^b
200 U/mL 凝血酶组	0.785 2±0.017 7	0.677 0±0.015 3 ^a	0.477 7±0.012 2 ^b	0.431 9±0.009 8 ^b

^a: $P < 0.05$, ^b: $P < 0.01$, 与对照组相比。

2.3 TUNEL 法检测细胞的凋亡程度比较 TUNEL 荧光染色法检测细胞凋亡,对照组细胞细胞核呈蓝色荧光,见极少量的绿色荧光,细胞核形状为较规整椭圆形,染色质分布均匀,未见明显凋亡细胞。在缺氧 1、6 h 时间点,随着凝血酶浓度的增加,绿色荧光细胞的数量较对照组有所增加,可见核形态不规则的细胞。缺氧 12 h,50 U/mL 和 100 U/mL 凝血酶浓度下,绿色荧光细胞的数量进一步增加,当凝血酶浓度达到 150 U/mL,绿色荧光细胞的数量明显增多,可见细胞核固缩、碎裂,细胞死亡数量增加。缺氧达到 24 h 后,细胞多数死亡,蓝色荧光细胞数量已明显减少。见表 2,图 2~5。

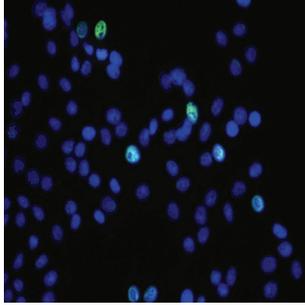


图 2 凝血酶 150 U/mL 作用 1 h (×200)

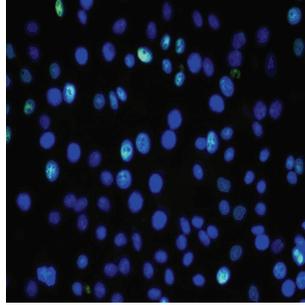


图 3 凝血酶 150 U/mL 作用 6 h (×200)

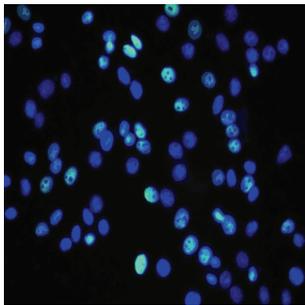


图 4 凝血酶 150 U/mL 作用 12 h (×200)

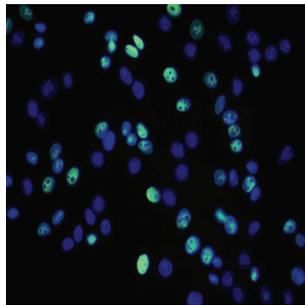


图 5 凝血酶 150 U/mL 作用 24 h (×200)

表 2 不同时间不同浓度凝血酶细胞的凋亡率比较

组别	样本 1	样本 2	样本 3	$\bar{x} \pm s$
1 h				
对照组	9.09	6.36	3.85	6.43 ± 2.62
50 U/mL 凝血酶组	10.47	8.14	2.54	7.05 ± 4.08
100 U/mL 凝血酶组	7.87	9.27	6.74	7.96 ± 1.27
150 U/mL 凝血酶组	4.23	9.53	6.28	6.68 ± 2.67
200 U/mL 凝血酶组	5.26	11.34	10.16	8.92 ± 3.22
6 h				
对照组	4.23	6.77	10.59	7.20 ± 3.20
50 U/mL 凝血酶组	20.97	15.44	16.87	17.76 ± 2.87
100 U/mL 凝血酶组	25.00	20.33	18.35	21.23 ± 3.41
150 U/mL 凝血酶组	31.43	26.28	25.44	27.72 ± 3.24
200 U/mL 凝血酶组	50.51	44.63	38.45	44.53 ± 6.03
12 h				
对照组	5.26	6.41	8.13	6.60 ± 1.44
50 U/mL 凝血酶组	28.26	22.49	19.53	23.43 ± 4.44
100 U/mL 凝血酶组	32.14	26.87	28.51	29.17 ± 2.70

续表 2 不同时间不同浓度凝血酶细胞的凋亡率比较

组别	样本 1	样本 2	样本 3	$\bar{x} \pm s$
150 U/mL 凝血酶组	51.56	37.61	43.15	44.11 ± 7.02
200 U/mL 凝血酶组	60.78	51.65	47.52	53.32 ± 6.79
24 h				
对照组	11.11	12.43	8.63	10.72 ± 1.93
50 U/mL 凝血酶组	33.75	36.74	26.55	32.35 ± 5.24
100 U/mL 凝血酶组	58.75	45.28	44.61	49.55 ± 7.98
150 U/mL 凝血酶组	62.50	65.33	55.57	61.10 ± 5.02
200 U/mL 凝血酶组	69.57	70.34	61.23	67.05 ± 5.05

3 讨 论

缺血缺氧是缺血性脑卒中导致神经损伤的重要因素。研究发现,大脑能够耐受低氧而不产生功能性损害的时间约为 5 min,如果缺血时间较长,将导致神经细胞发生不可逆性死亡。另一方面,凝血酶在缺血性脑卒中发生发展中的作用越来越受到学术界的重视,凝血酶不仅是血液凝固血栓形成的关键水解酶,而且也通过与蛋白酶活化受体(PAR)结合发挥对神经细胞的毒性作用。很多研究证明,凝血酶原 mRNA 在脑组织,尤其是对缺血敏感的组织,如大脑皮质、纹状体、下丘脑、海马和小脑均有表达。缺血性脑血管病患者及其高危人群中,神经细胞内凝血酶原的 mRNA 的表达上调,凝血酶生成增加^[7]。研究认为凝血酶还可能通过与其受体结合,诱导炎性细胞与血管内皮细胞膜上黏附分子 ICAM-1、VCAM-1 结合进而向血管外浸润,表达和产生单核细胞趋化蛋白(MCP-1)和 IL-6、IL-8、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、干扰素(IFN)、核转录因子 κ B(NF- κ B)等炎症因子^[10-12],促发炎症反应,加重神经细胞损害。MCAO 模型大鼠的缺血中心区域凝血酶的活性增加,凝血酶原基因表达上调可持续数小时。

体外实验显示,凝血酶对神经元具有损伤作用,凝血酶的非蛋白水解活性可以激活小胶质细胞,使小胶质细胞胞内钙离子明显增加,增强小胶质细胞吞噬作用。体内实验研究表明,凝血酶注入脑内 6 h 后可检测到凋亡的神经细胞,并且 Caspase-3 的活性明显增加^[10];凝血酶可诱导脑 VEC 炎性黏附分子表达,改变血脑屏障(BBB)的通透性^[13]。所以本研究采用对 PC12 细胞进行体外培养,利用 NGF 刺激诱导 PC12 细胞,使其向神经元分化,用于神经元的凝血酶合并缺氧模型的建立;旨在通过本模型探讨凝血酶毒性反应在 AIS 病理生理过程中的地位,从而更加真实地模拟 AIS 后神经细胞所处的微环境,更加贴近于临床。凝血酶对于神经元的毒性作用与时间、剂量呈依赖关系。本研究观察了不同浓度(0、50、100、150、200 U/mL)的凝血酶在不同时间点(1、6、12、24 h)对 PC12 细胞分化的影响。结果显示,凝血酶对 PC12 细胞具有直接的毒性损伤作用,低浓度的凝血酶作用较短时间可能对细胞具有一定的保护作用,随着作用时间的延长,凝血酶对细胞毒性损伤作用增加。MTT 对细胞存活率的检测结果表明 50 U/mL 低浓度的凝血酶可能对细胞具有一定的保护作用,原因可能是低浓度凝血酶(50 U/mL)在缺氧 1 h 左右细胞处于对缺氧损伤的可逆修复期,此时如果马上进行氧的供应可以降低细胞的损伤,与之前文献的报道相符。随着作用时间的延长,在 6、12、24 h 均对细胞具有毒性损伤作用,150 U/mL 凝血酶在作用 12

h 后对细胞的损伤与对照组相比差异具有统计学意义。而 24 h 组的细胞存活率较低,不利于之后实验的进行。6 h 组 200 U/mL 凝血酶与 12 h 组 150 U/mL 凝血酶相比,二者对细胞的损伤无明显差异,而 150 U/mL 的凝血酶与脑出血血肿内凝血酶浓度更为接近。凝血酶合并缺氧在不同时间均可以造成细胞损伤,随着时间的延长及凝血酶浓度的增加,对细胞的损伤逐渐加重,故选择 150 U/mL 凝血酶在缺氧作用 12 h 后为研究凝血酶合并缺氧对 PC12 细胞损伤的最佳模型条件。

凝血酶的分子信号作用是通过其受体的介导来实现的,但其作用的确切靶点及信号转导通路尚未明确,通过对凝血酶合并缺氧对 PC12 细胞损伤模型的探索,进一步研究凝血酶对神经细胞损伤的相关机制,为实现防治 AIS 后凝血酶毒性作用可能具有更大的理论和现实意义。

参考文献

[1] 中华医学会神经病学分会;脑血管病学组急性缺血性脑卒中诊治指南撰写组. 中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2010[J]. 中国全科医生,2011,14(12B):4013-4017.

[2] 吴江. 神经病学[M]. 北京:人民卫生出版社,2005:158.

[3] Karaszewski B, Wardlaw JM, Marshall I, et al. Early brain temperature elevation and anaerobic metabolism in human acute ischaemic stroke[J]. Brain, 2009, 132(Pt 4):955-964.

[4] Brouns R, De Deyn PP. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke[J]. Clin Neurol Neurosurg, 2009, 111(6):483-495.

[5] Mccoll BW, Allan SM, Rothwell NJ. Systemic infection, inflammation and acute ischemic stroke[J]. Neuroscience,

2009, 158(3):1049-1061.

[6] 安泳潼,夏玉叶,闵旸. 缺血性脑卒中的发病机制及其治疗[J]. 世界临床药物,2010,31(1):35-39.

[7] Chen B, Friedman B, Whitney MA, et al. Thrombin activity associated with neuronal damage during acute focal ischemia[J]. J Neurosci, 2012, 32(22):7622-7631.

[8] Ma L, Dorling A. The roles of thrombin and protease-activated receptors in inflammation [J]. Semin Immunopathol, 2012, 34(1):63-72.

[9] 何金婷,莽靖,郭洪亮,等. PC12 细胞转化为神经元样细胞的培养、鉴定及氧糖剥夺模型的制备[J]. 中国实验诊断学,2012,16(5):769-771

[10] Alabanza LM, Bynoe MS. Thrombin induces an inflammatory phenotype in a human brain endothelial cell line[J]. J Neuroimmunol, 2012, 245(1/2):48-55.

[11] Barreto AD, Alexandrov AV, Lyden P, et al. The argatroban and tissue-type plasminogen activator stroke study: final results of a pilot safety study[J]. Stroke, 2012, 43(3):770-775.

[12] Gorbacheva L, Pinelis V, Ishiwata S, et al. Activated protein C prevents glutamate- and thrombin-induced activation of nuclear factor-kappaB in cultured hippocampal neurons[J]. Neuroscience, 2010, 165(4):1138-1146.

[13] Hosomi N, Naya T, Kohno M, et al. Efficacy of anti-coagulant treatment with argatroban on cardioembolic stroke [J]. J Neurol, 2007, 254(5):605-612.

(收稿日期:2016-02-13 修回日期:2016-04-06)

(上接第 3765 页)

灌注损伤中的作用[J]. 中华麻醉学杂志,2012,32(3):371-375.

[5] Göksen D, Levent E, Kar S, et al. Serum adiponectin and hsCRP levels and non-invasive radiological methods in the early diagnosis of cardiovascular system complications in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus[J]. J Clin Res Pediatr Endocrinol, 2013, 5(3):174-181.

[6] Lin T, Qiu Y, Liu Y, et al. Expression of adiponectin and its receptors in type 1 diabetes mellitus in human and mouse retinas[J]. Mol Vis, 2013, 19(6):1769-1778.

[7] Leonardi F, Passeri B, Fusari A, et al. Cardiac troponin I (cTnI) concentration in an ovine model of myocardial ischemia[J]. Res Vet Sci, 2008, 85(1):141-144.

[8] 黄晓玲,陈柏梁,仇焯,等. 血清肌钙蛋白 I,血浆脑钠肽联合心脏 Tei 指数评估窒息新生儿心肌损伤及心功能[J]. 实用儿科临床杂志,2014,29(14):1112-1114.

[9] Lappas M, Mitton A, Mittion A, et al. In response to oxidative stress, the expression of inflammatory cytokines and antioxidant enzymes are impaired in placenta, but not adipose tissue, of women with gestational diabetes[J]. J Endocrinol, 2010, 204(1):75-84.

[10] Misra MK, Sarwat M, Bhakuni P, et al. Oxidative stress and ischemic myocardial syndromes[J]. Medical Science Monitor, 2009, 15(10):209-219.

[11] 杨进城,王志伟,李朝龙,等. 大鼠肝肠缺血再灌注对远隔器官损伤作用的实验研究[J]. 第一军医大学学报,2004,24(2):198-200,203.

[12] 王正,金振晓,易蔚,等. 脂联素受体 1 结合蛋白表达抑制对脂联素抗小鼠心肌缺血/再灌注损伤作用的影响[J]. 中国体外循环杂志,2014,12(2):117-120.

[13] 张磊,孙娟,李伟. 脂联素对高糖环境下胰岛细胞增殖及氧化应激水平的影响[J]. 基础医学与临床,2013,33(10):1066-1069.

[14] 何秋蓉,余霆,李萍. 代谢综合征氧化应激与血清脂联素水平的关系[J]. 四川大学学报:医学版,2009,40(4):623-627.

[15] 李美蓉,李兴. 脂联素对高糖环境心肌细胞氧化应激及凋亡的影响[J]. 医学研究杂志,2012,41(6):67-70.

[16] 袁芳,刘映红,田俊玮,等. 脂联素对糖尿病大鼠的肾脏保护作用及其抗氧化机制探讨[J]. 南方医科大学学报,2010,30(3):426-430.

(收稿日期:2016-02-11 修回日期:2016-04-06)