

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.36.004

棕榈酸通过上调 Wnt5a 基因表达抑制胰岛 β 细胞瘤 INS-1 细胞增殖*

吴杏儿^{1,2}, 孙世瑭¹, 郑磊^{2△}
(1. 广东省中山市人民医院分子诊断中心 528403; 2. 南方医科大学南方医院检验科, 广州 510515)

[摘要] **目的** 探索棕榈酸(PA)抑制胰岛 β 细胞瘤 INS-1 细胞增殖的机制。**方法** 使用 PA 刺激 INS-1 细胞进行时间及浓度梯度实验,采用 EdU 标记染色法检测细胞增殖率,通过实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)和蛋白质印迹法(Western blot)检测细胞 Wnt5a mRNA 及蛋白的表达。使用脂质体转染 siRNA 干扰 Wnt5a 表达,通过 EdU 标记法检测 PA 对细胞增殖率的影响。**结果** 与溶剂对照组相比,各 PA 刺激组的细胞增殖率均明显下降($P<0.05$)。时间梯度实验中,自 PA 刺激细胞 6 h 后 Wnt5a mRNA 及蛋白表达水平较溶剂对照组上升($P<0.05$);浓度梯度实验中,不同浓度 PA 刺激组 Wnt5a mRNA 及蛋白表达水平较溶剂对照组明显上升($P<0.05$)。与转染无意义 siRNA+PA 组相比,转染 siRNA-Wnt5a+PA 组的细胞增殖率上升($P<0.05$)。**结论** PA 在 mRNA 及蛋白水平均能上调 Wnt5a 基因表达,Wnt5a 可能参与介导 PA 抑制 INS-1 细胞增殖。**[关键词]** 脂毒性;Wnt5a;胰岛 β 细胞;细胞增殖
[中图分类号] R363.2+1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)36-4575-05

Palmitate inhibits proliferation of pancreatic β cell tumor INS-1 via up-regulating Wnt5a gene expression*
WU Xinger^{1,2}, SUN Shijun¹, ZHENG Lei^{2△}
(1. Molecular Diagnostic Center, Zhongshan Municipal People's Hospital, Zhongshan, Guangdong 528403, China;
2. Department of Clinical Laboratory, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the mechanism of palmitate (PA) for inhibiting the proliferation of pancreatic β-cell line INS-1. **Methods** INS-1 cells were treated with PA for conducting the time and concentration gradient experiments. The cellular proliferation rate was detected by adopting the EdU labeling staining method. Changes of Wnt5a mRNA and protein expression were detected by RT-qPCR and Western blot. The lipofectamine was used to transfect siRNA to interfere the Wnt5a expression, and the effect of PA on cellular proliferation was detected by using the EdU labeling method. **Results** Compared with the solvent control group, the cellular proliferation rate in each PA stimulating group was significantly decreased ($P<0.05$). In the time gradient experiment, the expression levels of Wnt5a mRNA and protein 6 h after PA stimulating were increased compared with the solvent control group ($P<0.05$). In the concentration gradient experiment, the Wnt5a mRNA and protein levels in different concentrations of PA stimulation groups were significantly increased compared with the solvent control group ($P<0.05$). Compared with transfecting nonsense siRNA+PA group, the cellular proliferation rate in the transfecting siRNA-Wnt5a+PA group was increased ($P<0.05$). **Conclusion** PA can up-regulate the expression of Wnt5a gene at both mRNA and protein level, and Wnt5a may mediate PA to inhibit the proliferation of INS-1 cells. **[Key words]** lipotoxicity; Wnt5a; pancreatic β cell; cell proliferation

胰岛 β 细胞受损是 2 型糖尿病(T2DM)的特征之一^[1]。血循环中游离脂肪酸(FFAs)升高可引起胰岛 β 细胞数量明显减少^[2]。体外实验发现,FFAs 对啮齿类动物及人的胰岛 β 细胞同时产生诱导凋亡及抑制增殖的效应^[2-3]。迄今已有大量研究阐释 FFAs 如何诱导胰岛 β 细胞凋亡,如 FFAs 激活神经酰胺通路、引起线粒体膜损伤等机制已被证实与 β 细胞凋亡关系紧密^[3-4]。然而,FFAs 抑制胰岛 β 细胞增殖的机制尚不明确。进一步研究 FFAs 抑制胰岛 β 细胞增殖的可能机制,有助于了解脂毒性参与糖尿病发生、发展的过程,以及为可能的药物开发甚至治疗策略改进提供依据。Wnt 信号通路是一类参与调节器官发育、细胞有丝分裂等过程的重要信号通路,其不同层面的信号分子在胰腺组织中均有不同程度的表达^[5]。目前鼠及人类 Wnt 配体家族成员已知的有 19 个,不同的 Wnt 蛋白亚型可起不同的生物学效应。笔者前期研究发现,Wnt5a 亚型在 β 细胞系 INS-1 细胞及小鼠胰岛中基础表达丰度高,可通过激活钙调蛋白依赖蛋白

* 基金项目:广东省医学科研基金项目(A2016097);中山市社会公益科技研究项目医疗卫生重大专项(2016B1001)。 作者简介:吴杏儿(1988—),博士后研究员,博士,主要从事分子诊断研究。 △ 通信作者,E-mail:suns200707@163.com。

激酶 II (CaMK II) 通路下调细胞周期蛋白 D1 (Cyclin D1) 表达; 此外, 首次报道了 Wnt5a 是抑制 β 细胞增殖的重要调控基因^[6]。有研究表明, Wnt5a 与脂代谢紊乱密切相关^[7]。然而 Wnt5a 是否参与介导脂毒性抑制 β 细胞增殖尚未明确。本实验利用饱和脂肪酸棕榈酸 (PA) 刺激大鼠胰岛 β 细胞系 INS-1 细胞, 观察其对 Wnt5a 基因表达的调控作用, 探讨 PA 抑制胰岛 β 细胞增殖的可能机制, 为进一步理解脂毒性损伤 β 细胞及治疗糖尿病提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料 大鼠胰岛 β 细胞瘤 INS-1 细胞[美国典型培养物保藏中心(ATCC)细胞库]。小牛血清和 RPMI-1640 培养基(美国 Gibco 公司); PA、牛血清蛋白 (BSA)、2-巯基乙醇、4-羟乙基哌嗪乙磺酸 (HEPES)、二甲亚砜(美国 Sigma 公司); 小干扰 RNA (siRNA, 广州吉捷生物科技有限公司); EdU 试剂盒(锐博生物技术公司); 转染试剂 LipofectamineTM 2000、PCR 引物(美国 Invitrogen 公司); 兔抗鼠 Wnt5a 抗体、兔抗鼠甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH, 14C10) 抗体(美国 Cell Signal Technology 公司); 辣根过氧化物酶标记 IgG (弗德生物技术有限公司); Eastep 通用型总 RNA 提取试剂盒、GoScriptTM 反转录试剂盒、GoTaq[®] qPCR Master Mix (美国 Promega 公司)。荧光定量 PCR 仪 7500 (美国 ABI 公司); 倒置荧光显微镜 (日本 Olympus 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组 大鼠胰岛 β 细胞瘤细胞 INS-1 培养在 37 °C、含 5% CO₂ 的培养箱, 每 100 毫升细胞培养液含有 10% 小牛血清、1% 青/链霉素双抗、2-巯基乙醇 0.35 μ L、碳酸氢钠 0.2 g、10 μ mol/L HEPES 0.1 mL。以含 0.25% 胰酶消化细胞传代, 每隔 24 h 更换 1 次培养液。细胞分组: (1) EdU 标记实验中细胞分为溶剂对照组 (BSA 组), 200 μ mol/L PA 刺激 24、48 h 组, 500 μ mol/L PA 刺激 24、48 h 组, 1 000 μ mol/L PA 刺激 24、48 h 组; (2) 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 实验中细胞分为: 溶剂对照组, 200 μ mol/L PA 刺激 1、6、12、24 h 组, 以及 200、500、1 000 μ mol/L PA 刺激 6 h 组; (3) Western blot 实验中细胞分为: 溶剂对照组, 200 μ mol/L PA 刺激 1、3、6、12、24、36 h 组, 以及 200、500、1 000 μ mol/L PA 刺激 6 h 组; (4) siRNA 转染实验中细胞分为: 转染无意义 siRNA 组 (NC 组)、转染 siRNA-Wnt5a-1 组、转染 siRNA-Wnt5a-2 组、转染无意义 siRNA + 500 μ mol/L PA 组、转染 siRNA-Wnt5a-1 + 500 μ mol/L PA 组、转染 siRNA-Wnt5a-2 + 500 μ mol/L PA 组 (转染培养 36 h 后予 PA 继续共培养 24 h)。

1.2.2 EdU 标记染色法检测细胞增殖率 细胞染色: 细胞以 4×10^4 个/孔密度种植至铺有盖玻片的 24 孔板, 细胞贴壁后更换培养基, 进行转染或共培养, 离观察终点 2 h 前往培养基中加入 EdU 溶液 (终浓度为

50 μ mol/L), 按试剂盒说明固定细胞、染色及铺片。细胞增殖率计数: 使用倒置荧光显微镜, 观察 Appolo567 染色使用 550 nm 激发光, 观察 Hoechst3342 染色使用 350 nm 激发光, 放大倍数为 400 倍。每复孔等分 4 象限, 每个象限随机拍摄 3 张不同视野照片均计数, 分别计算细胞核 (Hoechst) 及增殖细胞 (Appolo) 染色细胞数, Appolo/Hoechst 比值为细胞增殖率, 每复孔 Hoechst 染色阳性细胞计数大于 1 000 个。同组设 3 个复孔, 取增殖率平均数及标准差。

1.2.3 脂质体法转染 siRNA 按 LipofectamineTM 2000 转染试剂盒操作说明, 分别将含有 1 μ g 无意义 siRNA, Wnt5a-siRNA-1 (5'-CAA GGA AUU CGU GGA CGC ACG AGA AdT d-3', 5'-UUC UCG UGC GUC CAC GAA UUC CUU GdT d-3') 及 Wnt5a-siRNA-2 (5'-GCA UCC UCA UGA ACU UGC ACA ACA AdT d-3', 5'-UUG UUG UGC AAG UUC AUG AGG AUG CdT d-3') 稀释液加入含无血清培养基的 EP 管中混匀, 缓慢加至含 1 μ L LipofectamineTM 2000 的 50 μ L 无血清培养基中, 混匀后室温静置 20 min 形成转染复合物。使用转染复合物培养细胞 6~8 h 后吸出转染复合物, 换含有血清的培养基继续培养, 总培养时间为 36 h。到达实验终点收集细胞用于 Western blot 检测或 EdU 标记染色进行细胞增殖率计数。

1.2.4 qRT-PCR 检测 Wnt5a 表达水平 RNA 转录为 cDNA: 按试剂盒说明柱提法冰面操作提对数生长期细胞总 RNA, 行反转录。按试剂盒说明进行反转录, 反应条件: 25 °C 退火 5 min, 延伸 1 h, 70 °C 灭活 15 min。cDNA 样本 -20 °C 保存备用。RT-PCR 反应体系: 反应总体积为 20 μ L, 包括反转录产物样品 5 μ L, 无酶核酸水 4 μ L, 正、反向引物各 0.8 μ L, Master Mix 2×10 μ L。CXR100 $\times 0.2$ μ L。反应条件: 95 °C 10 min, 95 °C 15 s 后 60 °C 1 min (40 个循环)。mRNA 相对表达水平采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算, 内标基因为 β -actin。

1.2.5 蛋白质印迹法 (Western blot) 检测细胞 Wnt5a 的表达 按分组处理细胞, 提取蛋白后用 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离蛋白质, 转膜, 4% BSA 封闭 2 h, PBS 洗膜 3 次后加一抗 (1:1 000), 4 °C 孵育过夜, 洗膜 3 次加二抗 (1:5 000) 室温孵育 1 h, 洗膜后于暗室中加入发光剂, 显影后定影。以 GAPDH 为内参, Image J 软件灰度扫描图像检测 Wnt5a 蛋白表达差异。

1.3 统计学处理 每组设置 3 次重复独立实验, 采用 SPSS11.0 软件进行统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析进行组间比较, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PA 对 INS-1 细胞增殖的影响 EdU 标记法检测不同浓度 PA 处理 INS-1 细胞 24、48 h 后细胞增殖

率的变化,结果显示,与溶剂对照组相比,PA各浓度处理组或同一浓度不同时间组的细胞增殖率明显下降,差异有统计学意义($P<0.05$),PA抑制INS-1细胞增殖具有浓度及时间依赖性,见图1。

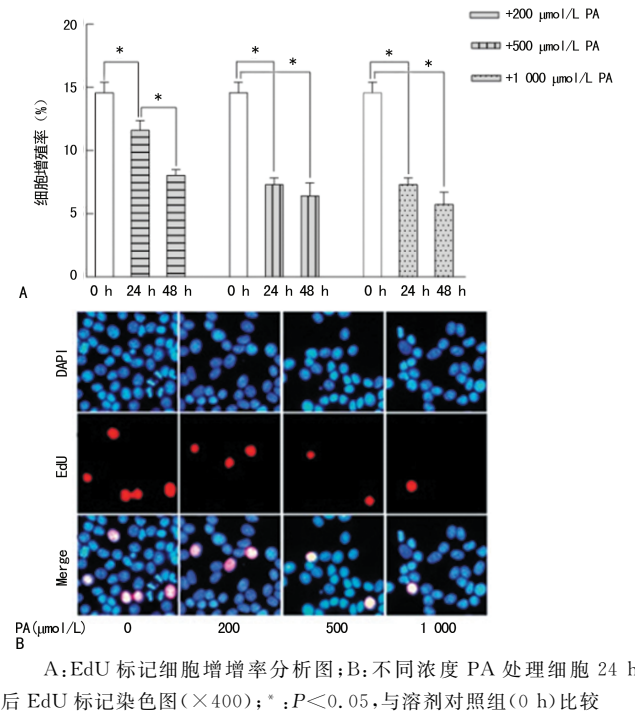


图1 PA对INS-1细胞增殖的影响

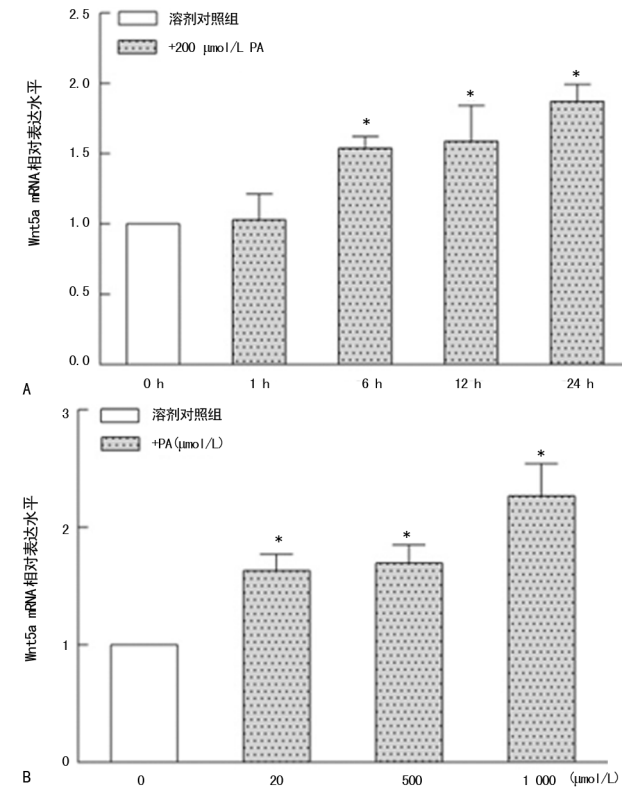


图2 PA对INS-1细胞Wnt5a mRNA转录水平的影响

2.2 PA对INS-1细胞Wnt5a mRNA转录水平的影响 qRT-PCR 检测 200 μmol/L PA 处理细胞后

Wnt5a mRNA 随时间表达变化,结果显示,自 6 h 起细胞 Wnt5a mRNA 表达水平明显升高($P<0.05$),见图 2A。使用不同浓度 PA 刺激细胞 6 h,结果显示,细胞 Wnt5a mRNA 表达水平随 PA 浓度升高逐渐增加($P<0.05$),见图 2B。

2.3 PA对INS-1细胞Wnt5a蛋白表达水平的影响 Western blot 检测 200 μmol/L PA 处理细胞后 Wnt5a 蛋白随时间表达变化,结果显示,自 6 h 起细胞 Wnt5a 的蛋白表达水平明显升高($P<0.05$),见图 3A。使用不同浓度 PA 刺激细胞 6 h,结果显示,细胞 Wnt5a 的蛋白表达水平随 PA 浓度升高逐渐增加($P<0.05$),见图 3B。

2.4 沉默Wnt5a表达对PA抑制INS-1细胞增殖的影响 使用两组不同的 siRNA 瞬时转染沉默 Wnt5a,转染 36 h 后 Western blot 验证 siRNA 序列的有效性,见图 4。使用 siRNA-Wnt5a 转染细胞 24 h 后予 500 μmol/L PA 继续刺激细胞 24 h,EdU 标记法检测细胞增殖率,结果显示,转染无意义 siRNA 情况下,PA 降低细胞增殖率;沉默 Wnt5a 后 PA 抑制细胞增殖的效应明显减弱,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 5。

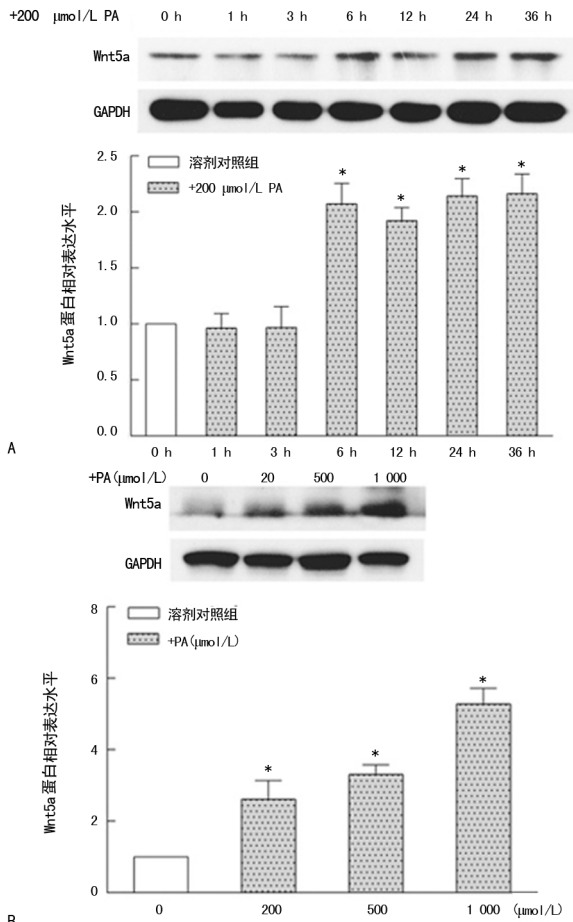
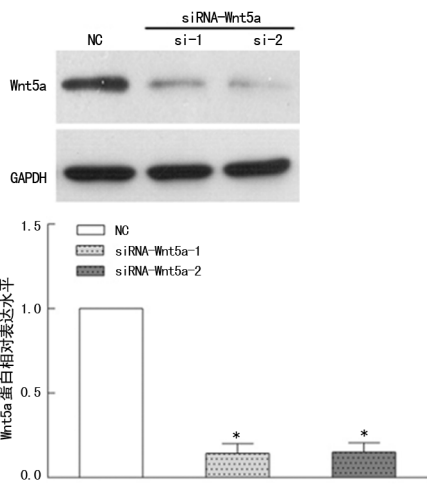
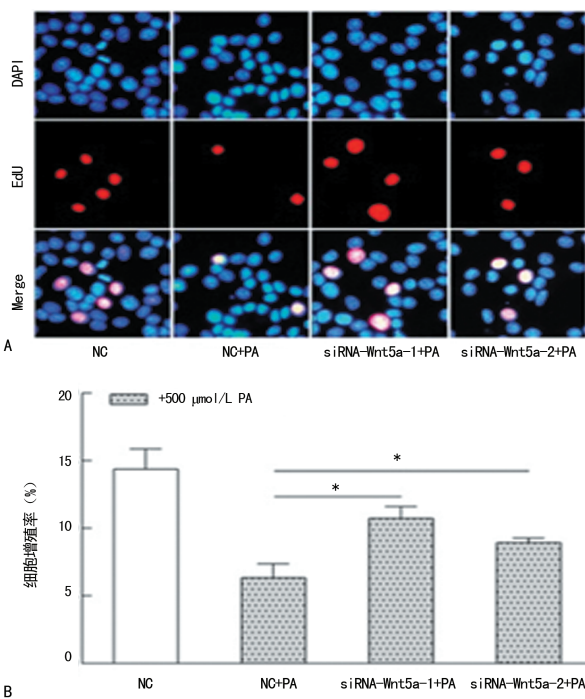


图3 PA对INS-1细胞Wnt5a蛋白表达的影响



A: Western blot 检测转染无意义 siRNA 或 siRNA-Wnt5a 各组中 Wnt5a 蛋白表达; B: 转染无意义 siRNA 或 siRNA-Wnt5a 各组中 Wnt5a 蛋白表达分析图; *: $P<0.05$, 与转染无意义 siRNA(NC 组) 比较

图 4 转染无意义 siRNA 或 siRNA-Wnt5a 各组中 Wnt5a 蛋白表达



A: 转染各组细胞 EdU 标记染色图($\times 400$); B: 转染各组细胞增殖率分析图; *: $P<0.05$, 与 NC+PA 组比较

图 5 EdU 标记转染 siRNA-Wnt5a 对 PA 抑制 INS-1 细胞增殖的影响

3 讨 论

脂毒性与 β 细胞数量减少密切相关, FFAs 对 β 细胞同时产生诱导凋亡及抑制增殖的效应, 大量研究已经对 FFAs 如何诱导 β 细胞凋亡进行了详尽的机制阐释: 如在多种不同来源的胰岛 β 细胞中神经酰胺通路已被证实与 β 细胞凋亡关系紧密^[3], FFAs 介导线粒体膜损伤导致一系列细胞因子(如细胞色素 C)释放, 可诱导 β 细胞凋亡^[4]。然而, FFAs 抑制胰岛 β 细胞增殖的机制尚不清楚。在 T2DM 疾病发展过程中,

脂、糖代谢紊乱常相伴出现, FFAs 可明显抑制葡萄糖诱导的 β 细胞增殖, 具有分泌功能的 β 细胞数量减少, 机体最终失代偿发展成为 T2DM^[8]。因此, 探索 FFAs 抑制 β 细胞增殖的机制对理解 T2DM 发病机制及研究治疗策略十分重要。

大量报道显示, Wnt5a 与脂代谢紊乱关系密切: T2DM 大鼠肝脏 Wnt5a 表达水平明显升高^[7]; 动物实验中 Wnt5a 基因敲除可减轻脂肪组织的炎性反应, 并同时改善胰岛素抵抗^[9]。Wnt5a 及其受体广泛表达于多种组织, HELLER 等^[10] 通过 RT-PCR 检测发现, 在人胰岛中 Wnt5a 是 Wnt 配体家族中表达丰度最高的亚型之一。过去发现 Wnt5a 在调控 β 细胞迁移及胰岛发育的过程中起重要作用, 但鲜有研究探索 Wnt5a 在调控 β 细胞增殖中的作用。笔者前期研究证明, Wnt5a 是抑制 β 细胞增殖的重要调控因子^[6]。因此, 本研究着重于探索 Wnt5a 是否参与介导 FFAs 抑制 β 细胞增殖。本研究使用了饱和脂肪酸 PA 刺激大鼠胰岛 β 细胞 INS-1, 通过 EdU 标记染色观察到细胞增殖明显被抑制。同时, 研究发现 PA 促进 Wnt5a mRNA 及蛋白的表达呈浓度及时间依赖性。为了进一步阐明 Wnt5a 在 PA 抑制 INS-1 细胞增殖中的作用, 本研究使用脂质体法瞬时转染有效的 siRNA 序列沉默 Wnt5a 基因表达, 再给予 PA 刺激细胞。通过 EdU 标记检测发现, 与转染无意义 siRNA+PA 组相比, 转染 siRNA-Wnt5a+PA 组细胞增殖率明显回升, 表明 Wnt5a 参与介导 PA 抑制 INS-1 细胞增殖过程, PA 通过上调 Wnt5a 基因表达抑制 INS-1 细胞增殖。

本研究观察到 PA 可调控 INS-1 细胞 Wnt5a 基因表达, 但相关调控机制尚未阐明。有报道指出, 在人类 Wnt5a 基因序列启动子区域存在核因子- κ B(NF- κ B)(-111/-101)、Forkhead-box (FOX, -780/-770)、Smad(-1965/-1953)等转录因子的结合位点^[11]。而在脂肪细胞及内皮细胞中 PA 可激活 NF- κ B 转录活性^[12-13]; 游离脂肪酸被证实可经 FOXO1 介导胰岛素-IGF-1 信号通路促进 β 细胞系 MIN6 细胞凋亡^[14]。至于转录因子 Smad2 和 Smad3, 则有报道指出它们与部分胰腺切除术后胰岛细胞增殖抑制密切相关^[15]。虽无胰岛 β 细胞或细胞系实验提供直接证据揭示 PA 对 Wnt5a 基因表达的调控机制, 但本课题组已正在进一步开展实验探索其具体机制。至于 PA 通过 Wnt5a 抑制 β 细胞增殖的下游通路机制, 也有待进一步实验探索。本课题组在前期已通过体外实验证实, 基础状态下 Wnt5a 通过磷酸化 CaMK II, 下调全细胞 β -catenin 水平, 抑制 β -catenin 与核内 TCF/LEF 形成活性转录复合物, 最终下调细胞周期因子 CycinD 1 的表达, 达到抑制细胞增殖的作用^[6]。但 PA 是否也通过 Wnt5a/CaMK II 信号通路抑制 INS-1 细胞增殖尚不清楚, 有待进一步研究。

综上所述, PA 抑制胰岛 β 细胞系 INS-1 细胞增

殖,其主要机制与调控 Wnt5a 基因表达有关。本实验中 PA 上调 Wnt5a 基因表达抑制 INS-1 细胞增殖的具体机制并未阐明,有待进一步研究探索。

参考文献

[1] CNOP M,WELSH N,JONAS J C,et al. Mechanisms of pancreatic β -cell death in type 1 and type 2 diabetes[J]. Diabetes,2005,54(Suppl 2):S97-107.

[2] MAEDLER K, OBERHOLZER J, BUCHER P, et al. Monounsaturated fatty acids prevent the deleterious effects of palmitate and high glucose on human pancreatic beta-cell turnover and function[J]. Diabetes,2003,52(3):726-733.

[3] MAEDLER K, SPINAS G A, DYNTER D, et al. Distinct effects of saturated and monounsaturated fatty acids on beta-cell turnover and function[J]. Diabetes,2001,50(1):69-76.

[4] KROEMER G, REED J C. Mitochondrial control of cell death[J]. Nat Med,2000,6(5):513-519.

[5] MOON R T, KOHN A D, DE FERRARI G V, et al. WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies [J]. Nat Rev Genet,2004,5(9):691-701.

[6] WU X, LIANG W, GUAN H, et al. Exendin-4 promotes pancreatic β -cell proliferation via inhibiting the expression of Wnt5a[J]. Endocrine,2017,55(2):398-409.

[7] 田丰,张亚杰,王琳. 非经典 Wnt 信号通路在 2 型糖尿病大鼠非酒精性脂肪性肝炎发生与发展中的作用[J]. 中华肝病杂志,2013,21(7):537-542.

[8] SHARMA R B, ALONSO L C. Lipotoxicity in the pancreatic beta cell: not just survival and function, but proliferation as well? [J]. Curr Diab Rep,2014,14(6):492.

[9] LETIC-GAVRILOVIC A, SHIBAIKE S, NIINA M, et al. Localization of chromogranin A and B, beta-endorphin and enkephalins in the submandibular glands of mice[J]. Shikakiso Igakkai Zasshi,1989,31(4):453-462.

[10] HELLER R S, KLEIN T, LING Z D, et al. Expression of Wnt, frizzled, sFRP, and DKK genes in adult human pancreas[J]. Gene Expr,2003,11(3/4):141-147.

[11] KATOH M, KATOH M. Transcriptional mechanisms of WNT5A based on NF- κ B, Hedgehog, TGF β , and Notch signaling cascades[J]. Int J Mol Med,2009,23(6):763-769.

[12] AJUWON K M, SPURLOCK M E. Palmitate activates the NF- κ B transcription factor and induces IL-6 and TNF- α expression in 3T3-L1 adipocytes [J]. J Nutr,2005,135(8):1841-1846.

[13] MALONEY E, SWEET I R, HOCKENBERRY D M, et al. Activation of NF- κ B by palmitate in endothelial cells[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol,2009,29(9):1370-1375.

[14] MARTINEZ S C, TANABE K, CRAS-MÉNEUR C, et al. Inhibition of Foxo1 protects pancreatic islet beta-cells against fatty acid and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis[J]. Diabetes,2008,57(4):846-859.

[15] EL-GOHARY Y, TULACHAN S, WIERSCH J, et al. A smad signaling network regulates islet cell proliferation [J]. Diabetes,2014,63(1):224-236.

(收稿日期:2018-06-12 修回日期:2018-08-25)

(上接第 4574 页)

activity of rosiglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ) agonists in animal model of bronchial asthma [J]. J Pharm Pharmacol,2015,67(10):1421-1430.

[10] ZIZZO G, COHEN P L. The PPAR- γ antagonist GW9662 elicits differentiation of M2c-like cells and up-regulation of the MerTK/Gas6 axis: a key role for PPAR- γ in human macrophage polarization[J]. J Inflamm (Lond),2015,12:36.

[11] IDA S, MURATA K, KANEKO R. Effects of pioglitazone treatment on blood leptin levels in patients with type 2 diabetes[J]. J Diabetes Investig,2018,9(4):917-924.

[12] BOLINDER J, LJUNGGREN Ö, JOHANSSON L, et al. Dapagliflozin maintains glycaemic control while reducing weight and body fat mass over 2 years in patients with type 2 diabetes mellitus inadequately controlled on metformin[J]. Diabetes Obes Metab,2014,16(2):159-169.

[13] FORST T, GUTHRIE R, GOLDENBERG R, et al. Efficacy and safety of canagliflozin over 52 weeks in patients

with type 2 diabetes on background metformin and pioglitazone[J]. Diabetes Obes Metab,2014,16(5):467-477.

[14] SINGH M, GUPTA N, KUMAR R. Effect of obesity and metabolic syndrome on severity, quality of Life, sleep quality and inflammatory markers in patients of asthma in India[J]. Pneumonol Alergol Pol,2016,84(5):258-264.

[15] SALAH A, RAGAB M, MANSOUR W, et al. Leptin and adiponectin are valuable serum markers explaining obesity/bronchial asthma interrelationship[J]. Egypt J Chest Dis Tuberc,2015,64(3):529-533.

[16] ZHENG H, ZHANG X, CASTILLO E F, et al. Leptin enhances TH2 and ILC2 responses in allergic airway disease [J]. J Biol Chem,2016,291(42):22043-22052.

[17] SUTHERLAND E R. Linking obesity and asthma[J]. Ann N Y Acad Sci,2014,1311:31-41.

[18] LEIRIA L O, MARTINS M A, SAAD M J. Obesity and asthma: beyond T(H)2 inflammation[J]. Metabolism,2015,64(2):172-181.

(收稿日期:2018-05-22 修回日期:2018-08-15)