

脑源性神经营养因子在 ATP 活化 BV2 小胶质细胞中的作用

金海祥, 吴周浩

(浙江省海宁中医院麻醉科 314400)

[摘要] **目的** 探讨脑源性神经营养因子(BDNF)在腺苷三磷酸(ATP)激活 BV2 小胶质细胞过程中的作用。**方法** 以不同浓度 ATP 孵育 BV2 小胶质细胞后,采用 Western blot 法定量检测细胞中 CD11b、BDNF 表达水平,ELISA 测定上清液中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)的分泌水平。再将 BV2 细胞用不同浓度 BDNF 清除剂原肌球蛋白相关激酶 B(TrkB)/Fc 预处理后给予 ATP 孵育,检测细胞中 CD11b、BDNF 表达水平的变化及上清液中 TNF- α 的分泌水平。最后加入外源性重组 BDNF,检测细胞内 CD11b 表达和上清液中 TNF- α 的水平变化。**结果** ATP 孵育 BV2 细胞后,细胞内 CD11b、BDNF 及上清液中 TNF- α 水平在一定范围内呈剂量时间依赖性增加。加入 TrkB/Fc 后,BV2 细胞中 CD11b、BDNF 及上清液中 TNF- α 表达水平在一定范围内呈剂量和时间依赖性降低。加入外源性 BDNF 后,细胞内 CD11b 及上清液中 TNF- α 水平又出现增加。**结论** BV2 小胶质细胞活化后细胞内 BDNF 增多,外源性补充 BDNF 可激活小胶质细胞,BDNF 在小胶质细胞的活化过程中可能发挥了重要作用。

[关键词] 神经病理性疼痛;BV2 小胶质细胞;脑源性神经营养因子;腺苷三磷酸;原肌球蛋白相关激酶 B

[中图分类号] R338.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)18-2467-04

Effect of brain-derived neurotrophic factor on BV2 microglia activated by ATP

Jin Haixiang, Wu Zhouhao

(Department of Anesthesiology, Haining Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Haining, Zhejiang 314400, China)

[Abstract] **Objective** To study the effect of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the process of adenosine triphosphate (ATP) activating BV2 microglia. **Methods** BV2 microglia was cultured by adding different concentrations of ATP. Then the expression level of intracellular CD11b and BDNF and the secretion level of TNF- α in the supernatant were quantitatively determined by Western blot. BV2 microglia was treated by different concentrations of BDNF scavenger tyrosine kinase receptors B (TrkB)/Fc and incubated by ATP. The expression level of intracellular CD11b and BDNF and the secretion level of TNF- α in the supernatant were measured. Finally adding exogenous recombinant BDNF into cultured BV2 microglia, intracellular changes of CD11b and supernatant TNF- α levels were detected. **Results** After adding ATP for cultivating BV2 microglia, intracellular CD11b and BDNF expression levels and supernatant TNF- α level were increased with a dose- and time-dependent manner in some ranges. After adding TrkB/Fc, the levels of intracellular CD11b and BDNF expression and supernatant TNF- α level were decreased with a dose- and time-dependent manner in some range. CD11b and BDNF expression levels was decreased in a dose- and time-dependent manner. Adding exogenous BDNF, the levels of intracellular CD11b and BDNF expression and supernatant TNF- α level were increased again. **Conclusion** Intracellular BDNF expression is increased when BV2 microglia is activated and replenishing exogenous BDNF can activate microglia. Therefore BDNF may play an important role in the microglia activation process.

[Key words] neuropathic pain; BV2 microglia; brain-derived neurotrophic factor; adenosine triphosphate; tyrosine kinase receptor B

神经病理性疼痛(neuropathic pain, NPP)是创伤或者疾病直接累及躯体感觉神经系统后导致的疼痛,它可以继发于神经损伤、恶性肿瘤、糖尿病及缺血性疾病等。指南推荐将三环类抗抑郁药、加巴喷丁、普瑞巴林、血清去甲肾上腺素再摄取抑制剂作为一线用药,阿片类药物、曲马多作为二线药物治疗 NPP。一项随机临床试验发现,只有不到 50% 的患者疼痛控制满意^[1]。目前 NPP 的发生、发展及潜在调控的具体机制尚不明确。大量研究证实,NPP 的与小胶质细胞活化有密切关系^[2-5]。Trang 等^[6]发现在离体培养的小胶质细胞中腺苷三磷酸(ATP)可通过 P2X4 受体激活小胶质细胞介导脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)合成和释放,并且 BDNF 的合成和释放是 Ca²⁺ 和 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38-MAPK)依赖的。Zhou 等^[7]向 SD 大鼠鞘内注射

BDNF 可通过激活小胶质细胞引起长时程增强和机械高敏。所以,离体条件下,激活的小胶质细胞可以释放 BDNF 促进 NPP 的产生,且在动物实验中应用 BDNF 同样能促进疼痛发生。体内条件 BDNF 来源广泛,神经元、星形胶质细胞和小胶质细胞均可合成分泌^[8-9]。关于离体条件下 BDNF 直接作用于小胶质细胞时小胶质细胞自身发生何种变化仍然缺乏实验研究。本研究通过设计一系列离体实验,外源加入 BDNF 模拟小胶质细胞分泌过程,探讨在小胶质细胞来源的 BDNF 和小胶质细胞活化之间是否存在一定的反馈调节机制,从而促进 NPP 的发生、发展。

1 材料与方法

1.1 主要材料与仪器 BV2 鼠源性小胶质细胞株购自中科院细胞资源中心,原肌球蛋白相关激酶 B Fc 片段(tropomyo-

sin-related kinase B/Fc, TrkB/Fc) 购自美国安迪生科技公司, ATP 购自美国 Sigma 公司; 一抗: 兔抗鼠 BDNF 多克隆抗体、兔抗鼠 CD11b 多克隆抗体购自美国 Santa 公司, 抗 α 微管蛋白 α -Tubulin、抗磷酸甘油醛脱氢酶 GAPDH 购自美国 Santa Cruz 公司; 二抗: 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG、碳酸盐缓冲液购自美国 Santa 公司, 胎牛血清、伊格乐培养基 DMEM 购自美国 Gibco 公司, 十二烷基硫酸钠 (SDS)、聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE)、BCA 蛋白浓度检测试剂盒购自南京碧云天公司, Tween 20、TBS 购自 Sigma 公司, PVDF 膜购自美国 Millipore 公司, 脱脂奶粉购自上海光明乳业有限公司, 免疫印迹化学发光试剂 ECL 购自美国 Santa Cruz 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞复苏 从液氮罐中取出冻存 BV2 细胞的冻融管, 直接放入 37 °C 的水中水浴, 快速解冻, 当细胞完全解冻时, 将液体移入离心管, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 加入新鲜培养液 DMEM, 重悬细胞, 移入培养瓶中, 37 °C、5% CO₂ 培养箱孵育。细胞传代: 吸弃培养瓶内的 DMEM, 用 PBS 液清洗 2 次, 然后加入 1 mL 0.25%~0.02% EDTA-Trypsin, 消化 2~5 min, 倒置显微镜观察, 发现细胞质回缩、细胞间隙增大后, 用吸管轻轻吹打细胞, 加入离心管中, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 加入 DMEM, 用吸管吹打至细胞混匀, 移入培养瓶中, 通常按 1:4 进行传代。

1.2.2 检测 ATP 对小胶质细胞的影响 BV2 细胞以相应密度接种入 6 孔培养板, 贴壁 24 h 后, 进行各种药物处理。采用 ATP (0、10、50、500、1 000 μ mol/L) 处理, 用蛋白免疫印迹测量 BV2 细胞中的 CD11b、BDNF 水平, 用 ELISA 测量上清液中肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 水平。用 500 μ mol/L ATP 处理 BV2 细胞, 于加入前及加入后 15、60、120 min 时用同样方法测定上述参数。观察不同剂量 ATP 对小胶质细胞的影响及最佳作用剂量, 并观察 500 μ mol/L ATP 不同作用时间对小胶质细胞的影响。

1.2.3 检测 TrkB/Fc 对小胶质细胞的影响 采用对照组、ATP 组、TrkB/Fc、ATP+TrkB/Fc 1 μ g、ATP+TrkB/Fc 5 μ g、ATP+TrkB/Fc 10 μ g 处理 60 min, 其中 ATP 浓度为 500 μ mol/L, TrkB/Fc 应加入培养孔中预先孵育。测定 BV2 细胞中的 CD11b、BDNF 及上清液中 TNF- α 水平。用 ATP+TrkB/Fc 10 μ g 处理 BV2 细胞, 于加入前及加入后 15、60、120 min 时用同样方法测定上述参数。观察不同剂量 TrkB/Fc 对小胶质细胞的影响及最佳作用剂量, 并观察 ATP+TrkB/Fc 10 μ g 不同作用时间对小胶质细胞的影响。

1.2.4 检测 BDNF 对小胶质细胞的影响 采用空白对照组及 BDNF 1、10、100 ng 3 个剂量组。测定 BV2 细胞中的 CD11b 及上清液中 TNF- α 水平。用 BDNF 处理 BV2 细胞, 于加入前及加入后 15、60、120 min 时用同样方法测定上述参数。观察不同剂量 BDNF 对小胶质细胞的影响及最佳作用剂量, 并观察 BDNF 10 ng 不同作用时间对小胶质细胞的影响。

1.2.5 蛋白免疫印迹 将上样液于 10% SDS-PAGE 上进行电泳分离后, 蛋白半干转入 PVDF 硝酸纤维膜上, 将 PVDF 膜浸入含 5% 的脱脂奶粉的 TBST 封闭液中, 置于水平摇床上, 室温封闭 2 h。用 TBST 配制一抗兔抗鼠 BDNF 单克隆抗体 (工作浓度为 1:200)、CD11b 单克隆抗体 (工作浓度为 1:

200)、抗 α -Tubulin (工作浓度为 1:1 000)、抗 GAPDH (工作浓度为 1:1 000) 于 4 °C 孵育 18 h 后 TBST 清洗 3 次, 每次 5 min, 再用 TBST 配制二抗辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG (工作浓度为 1:5 000, 37 °C 孵育 2 h。然后用 TBST 清洗 3 次, 每次 5 min。用 ECL 试剂盒的 A 液和 B 液各 0.5 mL, 混匀后与膜于室温下作用 60 s, 置膜片于二层保鲜膜之间, 将膜片吸附蛋白面朝上, 置于 X 光片盒中, 暗室曝光。蛋白表达水平以目的蛋白与内参灰度比值表示。CD11b 以 α -Tubulin 内参, BDNF 以 GAPDH 内参。

1.2.6 ELISA 将上清液加入酶标包被板孔, 分别设空白孔、待测样品孔, 在酶标包被板上待测样品孔中先加样品稀释液 40 μ L, 然后再加待测样品 10 μ L (样品最终稀释度为 5 倍)。将样品加于酶标板孔底部时尽量不触及孔壁, 轻轻晃动混匀。用封板膜封板后置 37 °C 温育 30 min。将 20 倍浓缩洗涤液用蒸馏水 20 倍稀释后备用。小心揭掉封板膜, 弃去液体, 甩干, 每孔加满洗涤液, 静置 30 s 后弃去, 如此重复 5 次, 拍干。每孔加入酶标试剂 50 μ L, 空白孔除外。再次按上述方法温育, 洗涤。每孔先加入显色剂 A 50 μ L, 再加入显色剂 B 50 μ L, 轻轻振荡混匀, 37 °C 避光显色 15 min。每孔加终止液 50 μ L, 终止反应。以空白空调零, 450 nm 波长依序测量各孔的吸光度 (A 值)。测定应在加终止液后 15 min 以内进行。

1.3 统计学处理 数据采用 SPSS11.5 统计软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 同组内不同时间点比较采用 Kruskal-Wallis 检验; 组间比较用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

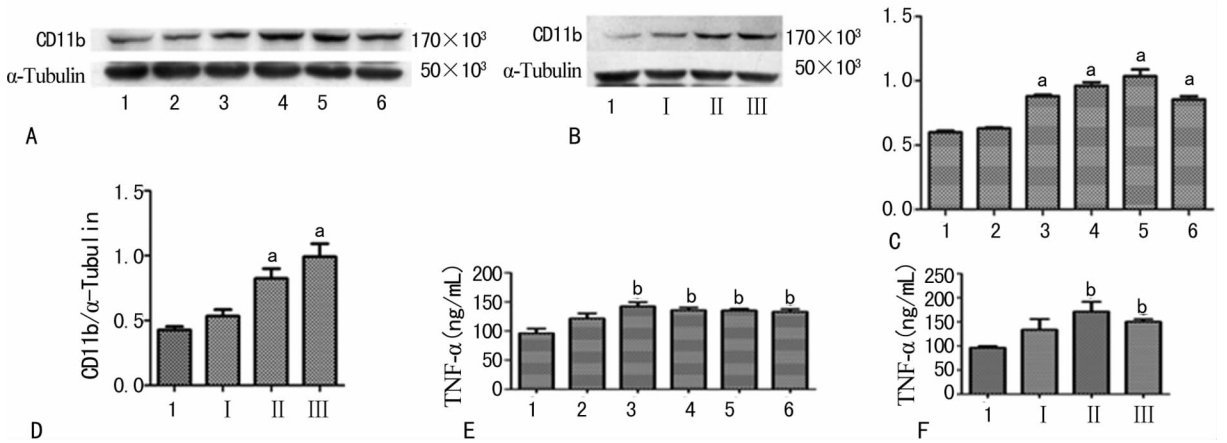
2 结果

2.1 ATP 对小胶质细胞的影响 ATP 可以剂量和时间依赖性激活小胶质细胞, 与对照组比较, CD11b 随 ATP 剂量的增加而增加 ($P < 0.01$), 在 500 μ mol/L 时 CD11b 分泌达高峰。用 500 μ mol/L 等剂量的 ATP 孵育小胶质细胞, 随时间的增加, CD11b 表达逐渐增加 ($P < 0.01$), 在 120 min 时 CD11b 分泌达到高峰; 与对照组比较, ATP 增强小胶质细胞 TNF- α 的释放呈剂量和时间依赖关系 ($P < 0.05$), 见图 1。在 ATP 激活小胶质细胞过程时 BDNF 水平增加, 与对照组比较, BDNF 随 ATP 剂量的增加而合成增多 ($P < 0.01$), 在剂量为 500 μ mol/L 时合成达高峰。用 500 μ mol/L 等剂量的 ATP 孵育小胶质细胞, 随时间的增加, BDNF 表达逐渐增加 ($P < 0.01$), 在 60 min 时 BDNF 表达达到高峰, 见图 2。

2.2 TrkB/Fc 对 ATP 与小胶质细胞的影响 BDNF 抑制剂 TrkB/Fc, 可以抑制 ATP 对小胶质细胞的活化能力。CD11b 随 ATP 剂量的增加而减少 ($P < 0.05$)。用 10 μ g 等剂量的 TrkB/Fc 孵育小胶质细胞, 随时间的增加, CD11b 表达逐渐减少 ($P < 0.05$); BDNF 随 TrkB/Fc 剂量增加而合成减少 ($P < 0.05$), 在剂量为 10 μ mol/L 时合成被抑制最强。用 10 μ mol/L 的 TrkB/Fc 孵育小胶质细胞, 随时间的增加, BDNF 表达逐渐减少 ($P < 0.05$); TrkB/Fc 抑制小胶质细胞 TNF- α 的释放呈剂量和时间依赖关系 ($P < 0.05$), 见图 3。

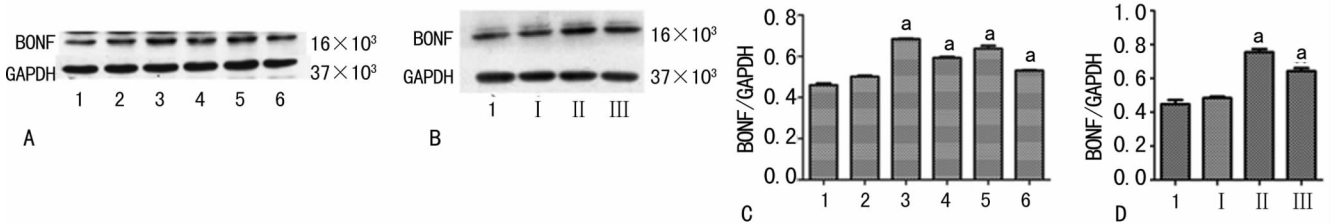
2.3 BDNF 对小胶质细胞的影响 加入外源性 BDNF, 同样可以激活小胶质细胞, 与对照组比较, CD11b 随 BDNF 剂量的增加而增加 ($P < 0.01$), 用 100 ng 等剂量的 BDNF 孵育小胶质细胞, 随时间的增加, CD11b 表达逐渐增加 ($P < 0.01$); TrkB/

Fc 抑制小胶质细胞 TNF- α 的释放呈剂量和时间依赖关系 ($P < 0.05$), 见图 4。



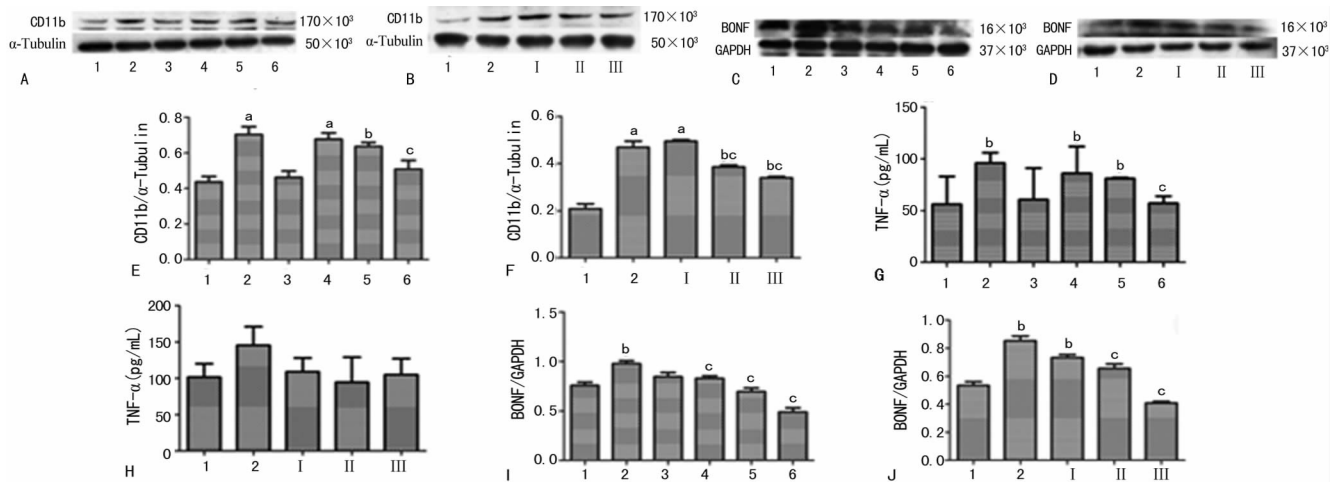
1: 对照组; 2: ATP 10 μ mol/L 组; 3: ATP 50 μ mol/L 组; 4: ATP 100 μ mol/L 组; 5: ATP 500 μ mol/L 组; 6: ATP 1 000 μ mol/L 组; I : ATP 15 min; II : ATP 60 min; III : ATP 120 min. A、B: BV2 小胶质细胞内 CD11b 及内参 α -tubulin 在不同剂量 ATP 下和不同作用时间的 Western blot 条带; C、D: 以 CD11b 和内参 α -tubulin 的比值量化 CD11b 在不同剂量 ATP 下和不同作用时间表达的变化; E、F: TNF- α 在不同 ATP 剂量下和不同作用时间分泌的变化; ^a: $P < 0.01$, ^b: $P < 0.05$, 与对照组比较。

图 1 ATP 对小胶质细胞的影响



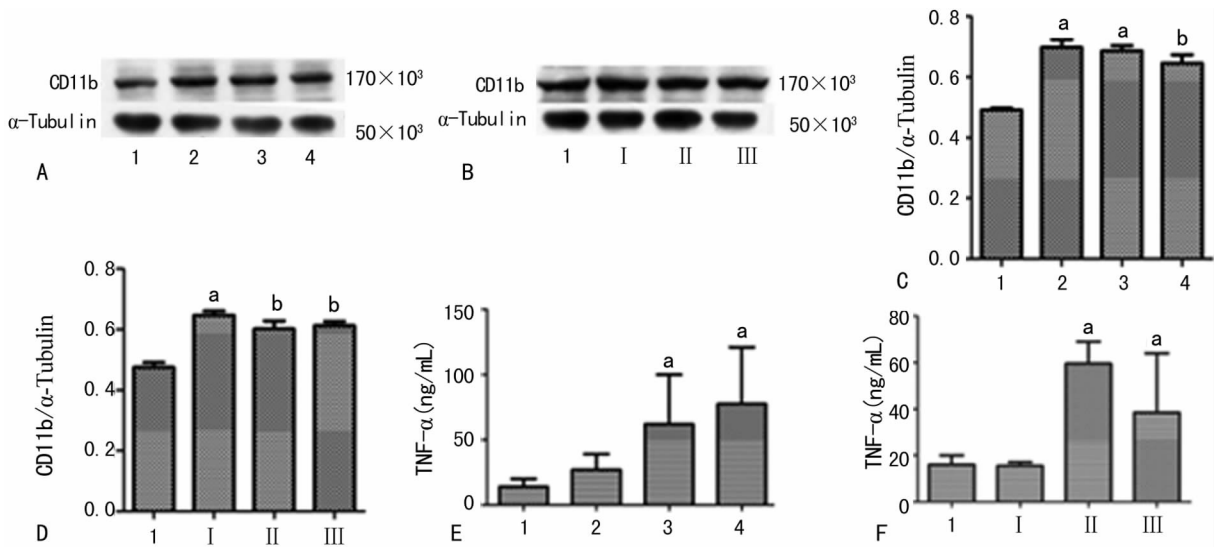
1: 对照组; 2: ATP 10 μ mol/L 组; 3: ATP 50 μ mol/L 组; 4: ATP 100 μ mol/L 组; 5: ATP 500 μ mol/L 组; 6: ATP 1 000 μ mol/L 组; I : ATP 15 min; II : ATP 60 min; III : ATP 120 min. A、B: BV2 小胶质细胞内 BDNF 及内参 GAPDH 在不同 ATP 剂量下和不同作用时间的蛋白印记条带; C、D: 以 BDNF 和内参 GAPDH 的比值量化 BDNF 在不同 ATP 剂量下和不同作用时间表达的变化; ^a: $P < 0.01$, 与对照组比较。

图 2 在 ATP 激活小胶质细胞过程中 BDNF 水平变化



1: 对照组; 2: ATP 组; 3: TrkB/Fc 组; 4: ATP+TrkB/Fc 1 μ g 组; 5: ATP+TrkB/Fc 5 μ g 组; 6: ATP+TrkB/Fc 10 μ g 组; I : ATP+FC 15 min; II : ATP+FC 60 min; III : ATP+FC 120 min. A、B: BV2 小胶质细胞内 CD11b 及内参 α -tubulin 在不同剂量 Trkb/Fc 下和不同作用时间的 Western blot 条带; C、D: BV2 小胶质细胞内 BDNF 及内参 GAPDH 在不同 Trkb/Fc 剂量下和不同作用时间的蛋白印记条带; E、F: 以 CD11b 和内参 α -tubulin 的比值量化 CD11b 在不同剂量 Trkb/Fc 下和不同作用时间表达的变化; G、H: TNF- α 在不同剂量 TRkb/Fc 下和不同作用时间分泌的变化; I、J: 以 BDNF 和内参 GAPDH 的比值量化 BDNF 在不同 Trkb/Fc 剂量下和不同作用时间分泌的变化; ^a: $P < 0.01$, ^b: $P < 0.01$, 与对照组比较; ^c: $P < 0.05$, 与 ATP 组比较。

图 3 TrkB/Fc 对 ATP 与小胶质细胞的影响



1:对照组;2:BDNF 1 ng 组;3:BDNF 10 ng 组;4:BDNF 100 ng 组; I :BDNF 15 min; II :BDNF 60 min; III :BDNF 120 min。A、B: BV2 小胶质细胞内 CD11b 及内参 α -tubulin 在不同剂量 BDNF 下和不同作用时间的 Western blot 条带;C、D:以 CD11b 和内参 α -tubulin 的比值量化 CD11b 在不同剂量 BDNF 下和不同作用时间表达的变化;E、F: TNF- α 在不同剂量 BDNF 下和不同作用时间分泌的变化;^a: $P < 0.01$, ^b: $P < 0.05$, 与对照组比较。

图 4 BDNF 对小胶质细胞的影响

3 讨 论

大量研究发现,小胶质细胞在 NPP 的起始和发展过程中发挥了重要的作用^[2-5]。小胶质细胞激活后上调细胞表面受体分子、增强促炎细胞因子释放等,如 CD11b^[10]、TNF- α ^[11-12]、前列腺素及白细胞介素等,从而调控神经系统兴奋性。研究发现许多炎症因子有增强突触间递质的信号传递,并促发突触后神经元的敏化的作用^[13-14]。BDNF 是神经营养因子家族的一员,它不仅促进神经元的生长和分化,还可以作为神经调质调控神经元兴奋性、突触可塑性在 NPP 中发挥重要的作用^[15-17]。Chen 等^[18]研究发现,BDNF 能否增强初级传入纤维末端 NMDA 受体作用,增强初级传入纤维和脊髓神经元之间的突触传递。在一些病理过程中正反馈机制往往发挥重要作用,但是对于小胶质细胞合成的 BDNF 是否具有自分泌刺激因子功能的研究仍然缺乏。因此,本研究进行了一系列实验来确认小胶质来源的 BDNF 是否能够进一步通过自分泌行为加强自身活化。通过实验,本研究发现 ATP 可以激活 BV-2 小胶质细胞,使其表面标志分子 CD11b 上调, TNF- α 分泌增多,并且在活化时发现 BDNF 的合成增多。加入 BDNF 清除剂清除 TrkB/Fc 后,ATP 对小胶质细胞活化能力减弱,CD11b 表达减少,合成 BDNF 减少, TNF- α 分泌也减少。补充外源性 BDNF,小胶质细胞再次出现活化,CD11b 合成增加, TNF- α 的释放增加。因此,本研究推测 BDNF 可能作为一种自分泌激活物在进一步促进在小胶质细胞过程中扮演着重要作用。虽然它在 NPP 中的详细作用机制仍需未来进行更深入的研究,但是本研究推测在疼痛药物开发中,将 BDNF 作为特定靶点可能有助于研发出止痛新药。随着对小胶质细胞功能认识的不断深化,也必将为治疗 NPP 这一困扰人类健康的难题提供更多的药物靶点和干预措施。

参考文献

[1] O'Connor AB, Dworkin RH. Treatment of neuropathic pain:

an overview of recent guidelines[J]. Am J Med, 2009, 122 (10):S22-32.

- [2] Trang T, Beggs S, Salter MW. ATP receptors gate microglia signaling in neuropathic pain[J]. Exp Neurol, 2012, 234(2):354-361.
- [3] Tsuda M, Inoue K, Salter MW. Neuropathic pain and spinal microglia: a big problem from molecules in 'small' glia [J]. Trends Neurosci, 2005, 28(2):101-107.
- [4] Tsuda M, Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, et al. P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury[J]. Nature, 2003, 424(6950):778-783.
- [5] Watkins LR, Milligan ED, Maier SF. Glial activation: a driving force for pathological pain[J]. Trends Neurosci, 2001, 24 (8):450-455.
- [6] Trang T, Beggs S, Wan X, et al. P2X4-receptor-mediated synthesis and release of brain-derived neurotrophic factor in microglia is dependent on calcium and p38-mitogen-activated protein kinase activation[J]. J Neurosci, 2009, 29 (11):3518-3528.
- [7] Zhou LJ. Brain-derived neurotrophic factor contributes to spinal long-term potentiation and mechanical hypersensitivity by activation of spinal microglia in rat[J]. Brain Behav Immun, 2010, 25(2):322-334.
- [8] Lindholm D, Castrén E, Hengerer B, et al. Differential regulation of nerve growth factor (NGF) synthesis in neurons and astrocytes by glucocorticoid hormones[J]. Eur J Neurosci, 1992, 4(5):404-410.
- [9] Rudge JS, Alderson RF, Pasnikowski E, et al. Expression of ciliary neurotrophic factor and the neurotrophins-nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin 3-in cultured rat hippocampal(下转第 2474 页)

膜免受有害物质的损伤,且对胰腺的炎症也有作用^[15]。瘦素可通过降低 SAP 时组织的炎症反应,改善组织血液循环等达到对胰腺组织的保护作用^[16]。在本研究中,给予外源性瘦素干预后的大鼠肝脏组织 NF- κ B 水平明显较 SAP 组降低,同时肝细胞的 AI 和血清 TNF- α 也有所下降,肝脏组织的病理评分降低,表明肝脏组织的 NF- κ B 活化降低后肝脏组织的损伤明显好转。外源性瘦素在 SAP 大鼠肝损伤模型中对肝脏组织中 NF- κ B 的活化有抑制作用,而 NF- κ B 的活化与 TNF- α 水平和肝细胞的 AI 存在正相关性,本研究发现外源性瘦素可通过抑制肝脏组织中 NF- κ B 的活化而减轻组织中的炎症介质的释放,减轻肝细胞的凋亡而达到对 SAP 并发肝损伤的保护作用。

但是本实验研究仅仅对于外源性瘦素的作用做了初步的研究,但瘦素抑制肝脏组织 NF- κ B 活化的具体机制尚未明确,有待进一步进行相关研究。

参考文献

- [1] Takeyama Y. Significance of apoptotic cell death in systemic Complications with severe acute pancreatitis[J]. *J Gastroenterol*, 2005, 40(1): 1-10.
- [2] Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89(6): 2548-2556.
- [3] Saidi RF, Chang J, Verb S, et al. The effect of methylprednisolone on warm ischemia-reperfusion injury in the liver[J]. *Am J Surg*, 2007, 193(3): 347-348.
- [4] Sarr MG, Banks PA, Bollen TL, et al. The new revised classification of acute pancreatitis 2012 [J]. *Surg Clin North Am*, 2013, 93(3): 549-562.
- [5] Andersson B, Appelgren B, Sjodin V, et al. Acute pancreatitis—costs for healthcare and loss of production[J]. *Scand J Gastroenterol*, 2013, 48(12): 1459-1465.
- [6] Yu HB, Zhang HF, Zhang X, et al. Resveratrol inhibits VEGF expression of human hepatocellular carcinoma cells through a NF-kappa B-mediated mechanism[J]. *Hepato-gastroenterology*, 2010, 57(102/103): 1241-1246.
- [7] 肖经纬, 李斌, 钟才高. 肝细胞凋亡机制及其检测方法的研究进展[J]. *国外医学(卫生学分册)*, 2006, 33(2): 93-96.
- [8] Malleo G, Mazzon E, Siriwardena AK, et al. TNF-alpha as a therapeutic target in acute pancreatitis—lessons from experimental models[J]. *Sci World J*, 2007, 30(7): 431-438.
- [9] 高建芝, 徐自超, 王庆志, 等. 核因子- κ B 与感染性休克大鼠肝细胞凋亡的关系[J]. *新乡医学院学报*, 2007, 24(5): 447-450.
- [10] 庄永敬, 曹云飞, 吴桂荣, 等. 缺血预处理对大鼠肝脏缺血/再灌注早期核因子 κ B 活性及细胞凋亡的影响[J]. *肝胆胰外科杂志*, 2009, 21(6): 431-434.
- [11] 邹自万, 郭贵海, 徐萍, 等. NF- κ Bp65、Caspase-3 在重症急性胰腺炎大鼠肝损伤中的表达意义[J]. *江西医药*, 2009, 44(11): 1069-1072.
- [12] Konturek PC, Jaworek J, Maniatoglou A, et al. Leptin modulates the inflammatory response in acute pancreatitis[J]. *Digestion*, 2002, 65(3): 149-160.
- [13] La Cava A, Matarese G. The weight of leptin in immunity. *Nature reviews*[J]. *Immunology*, 2004, 4(5): 371-379.
- [14] Sanchez-Margalet V, Martin-Romero C, Santos-Alvarez J, et al. Role of leptin as an immunomodulator of blood mononuclear cells: mechanisms of action [J]. *Clin Exp Immunol*, 2003, 133(1): 11-19.
- [15] Gonzalez A, Merino B, Marroqui L, et al. Insulin hypersecretion in islets from diet-induced hyperinsulinemic obese female mice is associated with several functional adaptations in individual beta-cells[J]. *Endocrinology*, 2013, 154(10): 3515-3524.
- [16] Dossin O. Laboratory tests for diagnosis of gastrointestinal and pancreatic diseases [J]. *Top Comp Anim Med*, 2011, 26(2): 86-97.
- [17] 肖经纬, 李斌, 钟才高. 肝细胞凋亡机制及其检测方法的研究进展[J]. *国外医学(卫生学分册)*, 2006, 33(2): 93-96.
- [18] Malleo G, Mazzon E, Siriwardena AK, et al. TNF-alpha as a therapeutic target in acute pancreatitis—lessons from experimental models[J]. *Sci World J*, 2007, 30(7): 431-438.
- [19] 高建芝, 徐自超, 王庆志, 等. 核因子- κ B 与感染性休克大鼠肝细胞凋亡的关系[J]. *新乡医学院学报*, 2007, 24(5): 447-450.
- [20] 庄永敬, 曹云飞, 吴桂荣, 等. 缺血预处理对大鼠肝脏缺血/再灌注早期核因子 κ B 活性及细胞凋亡的影响[J]. *肝胆胰外科杂志*, 2009, 21(6): 431-434.
- [21] 邹自万, 郭贵海, 徐萍, 等. NF- κ Bp65、Caspase-3 在重症急性胰腺炎大鼠肝损伤中的表达意义[J]. *江西医药*, 2009, 44(11): 1069-1072.
- [22] Konturek PC, Jaworek J, Maniatoglou A, et al. Leptin modulates the inflammatory response in acute pancreatitis[J]. *Digestion*, 2002, 65(3): 149-160.
- [23] La Cava A, Matarese G. The weight of leptin in immunity. *Nature reviews*[J]. *Immunology*, 2004, 4(5): 371-379.
- [24] Sanchez-Margalet V, Martin-Romero C, Santos-Alvarez J, et al. Role of leptin as an immunomodulator of blood mononuclear cells: mechanisms of action [J]. *Clin Exp Immunol*, 2003, 133(1): 11-19.
- [25] Gonzalez A, Merino B, Marroqui L, et al. Insulin hypersecretion in islets from diet-induced hyperinsulinemic obese female mice is associated with several functional adaptations in individual beta-cells[J]. *Endocrinology*, 2013, 154(10): 3515-3524.
- [26] Dossin O. Laboratory tests for diagnosis of gastrointestinal and pancreatic diseases [J]. *Top Comp Anim Med*, 2011, 26(2): 86-97.

(收稿日期: 2015-11-21 修回日期: 2016-03-06)

(上接第 2470 页)

- [9] astrocytes[J]. *Eur J Neurosci*, 1992, 4(6): 459-471.
- [10] Winkelstein BA, DeLeo JA. Nerve root injury severity differentially modulates spinal glial activation in a rat lumbar radiculopathy model: considerations for persistent pain[J]. *Brain Res*, 2002, 956(2): 294-301.
- [11] Ohtori S, Takahashi K, Moriya H, et al. TNF- α and TNF- α receptor type 1 upregulation in glia and neurons after peripheral nerve injury: studies in murine DRG and spinal cord[J]. *Spine*, 2004, 29(10): 1082-1088.
- [12] Kuno R, Wang J, Kawanokuchi J, et al. Autocrine activation of microglia by tumor necrosis factor- α [J]. *J Neuroimmunol*, 2005, 162(1): 89-96.
- [13] Samad TA, Moore KA, Sapirstein A, et al. Interleukin-1beta-mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity[J]. *Nature*, 2001, 410(6827): 471-475.
- [14] Obata K, Noguchi K. BDNF in sensory neurons and chronic pain[J]. *Neurosci Res*, 2006, 55(1): 1-10.
- [15] Santos AR, Comprido D, Duarte CB. Regulation of local translation at the synapse by BDNF[J]. *Prog Neurobiol*, 2010, 92(4): 505-516.
- [16] Park H, Mm P. Neurotrophin regulation of neural circuit development and function [J]. *Nature Rev Neurosci*, 2013, 14(1): 7-23.
- [17] Graciano L, Diogo C, Duarte CB. BDNF-induced local protein synthesis and synaptic plasticity [J]. *Neuropharmacology*, 2014, 76(C): 639-656.
- [18] Chen W, Walwyn W, Ennes HS, et al. BDNF released during neuropathic pain potentiates NMDA receptors in primary afferent terminals[J]. *Eur J Neurosci*, 2014, 39(9): 1439-1454.

(收稿日期: 2015-12-05 修回日期: 2016-03-16)