

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.19.004

Akt-eNOS 信号通路介导去甲肾上腺素调节内皮祖细胞动员*

姜其钧, 龚志刚, 李志刚, 丁世芳[△]

(广州军区武汉总医院心血管内科, 武汉 430070)

[摘要] **目的** 探讨去甲肾上腺素(NE)对小鼠内皮祖细胞(EPCs)增殖能力、迁移能力及从骨髓动员的影响,并分析其分子机制。**方法** 取 8 周大 C57 小鼠随机分为 3 组,各 5 只,分别为:空白对照组(皮下注射生理盐水,无手术),模型组(皮下注射生理盐水,左下肢肢体缺血),NE 组(皮下注射 NE 100 $\mu\text{mol}/100 \mu\text{L}$,左下肢肢体缺血)。采用小鼠左下肢股动脉结扎术制备肢体缺血模型,微渗泵持续泵入 NE,流式细胞仪检测小鼠骨髓、外周血和脾脏中 EPCs;培养人外周血 EPCs,用 NE 刺激,检测 EPCs 的增殖和迁移能力,以及 Akt-eNOS 信号通路的激活情况。**结果** NE 能够促进肢体缺血小鼠骨髓 EPCs 的动员,增加外周血和脾脏的 EPCs,NE 组与模型组比较,骨髓[(3.271 \pm 0.772)% vs. (1.320 \pm 0.256)%]、外周血[(0.261 \pm 0.041)% vs. (0.110 \pm 0.028)%]和脾脏[(4.671 \pm 0.345)% vs. (1.880 \pm 0.381)%]EPCs 均增加,差异均有统计学意义($P<0.01$)。NE 能促进 EPCs 的增殖和迁移能力,且能够呈浓度依赖性地激活 EPCs 内的 Akt-eNOS 信号通路。**结论** NE 通过 Akt-eNOS 促进 EPCs 的迁移和增殖,以及在小鼠骨髓中的动员。

[关键词] 内皮祖细胞;去甲肾上腺素;增殖能力;迁移能力;动员**[中图分类号]** R329**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)19-2602-04

Akt-eNOS signal pathway for mediating norepinephrine regulating mobilization of endothelial progenitor cells*

Jiang Qijun, Gong Zhigang, Li Zhigang, Ding Shifang

(Department of Cardiology, Wuhan General Hospital of Guangzhou Military Region, Wuhan, Hubei 430070, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of norepinephrine (NE) on the proliferation and migration capacity of endothelial progenitor cells (EPCs), and bone marrow mobilization and to analyze its molecular mechanism. **Methods** The 8-week old C57 mice were taken and randomly divided into 3 groups, 5 cases in each group: the blank control group (subcutaneous injection of normal saline without operation), model group (subcutaneous injection of normal saline and ischemia in left lower extremity) and NE group (subcutaneous injection of NE 100 $\mu\text{mol}/100 \mu\text{L}$ and ischemia in left lower extremity). The limb ischemia model was prepared by adopting the femoral arterial ligation in mouse left lower extremity, then NE was continuously pumped by the micro-osmotic pump. The EPCs contents from bone marrow, peripheral blood and spleen were assayed with the flow cytometric analyzer; human peripheral blood EPCs were cultured and stimulated by NE. The proliferation and migration capacity, and the activation situation of Akt and eNOS signal pathway were detected. **Results** NE could promote the mobilization of bone marrow EPCs in limb ischemia mice, increased the EPCs quantity of peripheral blood and spleen, comparing the NE group with the model group, the EPCs quantity was increased for bone marrow[(3.271 \pm 0.772)% vs. (1.320 \pm 0.256)%], peripheral circulation[(0.261 \pm 0.041)% vs. (0.110 \pm 0.028)%] and spleen[(4.671 \pm 0.345)% vs. (1.880 \pm 0.381)%], the differences were statistically significant ($P<0.01$). NE could promote the proliferation and migration capacity, moreover could activate the Akt-eNOS signal pathway in EPCs with a dose dependent manner. **Conclusion** NE could promote the proliferation and migration of EPCs and mouse bone marrow mobilization via the Akt-eNOS signal pathway.

[Key words] endothelial progenitor cells; norepinephrine; proliferation capacity; migration capacity; mobilization

骨髓中有丰富的神经纤维分布,包括交感神经末梢^[1]。在烫伤、外伤或肢体缺血的情况下,体内交感神经的活动程度会持续增强 1~2 周,并引起神经递质的持续释放^[2]。研究表明,在上述情况下,骨髓中的内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)也被大量动员到血液中,参与各种损伤处血管的新生或内皮的修复^[3]。而 EPCs 的释放与骨髓中交感神经活动程度的关系目前仍不是特别清楚。交感神经参与人体对寒冷的适应,以及肿瘤发生等多个病理、生理过程^[4]。骨髓中的交感神经纤维能够向神经周围分泌大量的神经递质,如去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)、多巴胺等。其中 NE 能够刺激人体棕色脂肪细胞和肿瘤细胞释放血管内皮生长因子(vascular

endothelial growth factor, VEGF)和白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)等细胞因子^[5],这些细胞因子在人体血管生成中发挥着关键作用。既往的研究还发现,这些神经递质能够参与调节许多血液细胞的生成,如单核细胞、红细胞及髓细胞的生成,促进基质细胞衍生因子-1(stromal cell-derived factor-1, SDF-1)等细胞因子的释放,调节部分祖细胞的动员^[6]。而本文的研究重点是探讨交感神经的主要神经递质 NE 是否能够参与调节 EPCs 的动员,以及其分子机制。

1 材料与方法

1.1 动物来源 8 周龄 C57 小鼠 15 只,均由湖北省疾病预防控制中心动物房提供。

1.2 仪器与试剂 Histopaque-1083 分离液和 Histopaque 1077 淋巴细胞分离液均购自美国 Amersham Biosciences 公司; VEGF、成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)均购于英国 Peprotech 公司; 10% 戊巴比妥、四甲基偶氮唑盐(MTT)、0.25% 胰酶、NE 均购自美国 Sigma 公司; 异硫氰酸荧光素(FITC)标记的抗小鼠 CD34 抗体、藻红蛋白(PE)标记的抗小鼠 Flk-1 抗体和藻蓝蛋白(APC)标记的抗小鼠 CD45 抗体均购自美国 BD Biosciences 公司; M199 培养基、胎牛血清(FBS)均购自美国 Gibco 公司; 鼠抗人磷酸化 Akt IgG 抗体、鼠抗人 Akt IgG 抗体、鼠抗人 eNOS IgG 抗体均购自美国 Cell Signaling technology 公司; 鼠抗人磷酸化 eNOS IgG 抗体购自英国 Abcam 公司。24 孔 Transwell 小室购自美国 Millipore 公司; MACSQuant 流式分析仪购自德国 Bergisch Gladbach 公司; 1002 型号 Alzet 微量注射泵购自美国 Alzet 公司。

1.3 方法

1.3.1 分组和肢体缺血模型制备 取 8 周大 C57 小鼠, 随机分为 3 组, 各 5 只, 分别为: 空白对照组(皮下注射生理盐水, 无手术), 模型组(皮下注射生理盐水, 左下肢肢体缺血), NE 注射手术组(NE 组, 皮下注射 NE 100 $\mu\text{mol}/100 \mu\text{L}$, 左下肢肢体缺血), 根据分组分别采取手术和药物干预。肢体缺血模型小鼠均采用腹腔注射 10% 戊巴比妥麻醉, 切开左下肢前侧皮肤, 显微镜下分离和结扎左股动脉的近侧和远侧, 剪断股动脉及其分支, 消毒后缝合皮肤, 于小鼠背侧皮下植入装有药物的 Alzet 微量注射泵(含 NE 100 $\mu\text{mol}/100 \mu\text{L}$ 或生理盐水), 继续于无特殊病原体(SPF)的环境饲养 1 周。

1.3.2 外周血、骨髓和脾脏 EPCs 的流式分析 将手术干预后的小鼠饲养 1 周后处死, 采集外周血、脾脏和骨髓组织, 使用 Histopaque-1083 分离液分离小鼠外周血、脾脏组织匀浆和骨髓细胞冲洗液中的单个核细胞, 加入 FITC 标记的抗小鼠 CD34 抗体, PE 标记的抗小鼠 Flk-1 抗体和 APC 标记的抗小鼠 CD45 抗体, 冰上孵育 30 min, 磷酸盐缓冲液(PBS)洗 2 遍, 4% 甲醛固定, MACSQuant 流式分析仪计数样品中 CD45⁻/CD34⁺/Flk-1⁺ 细胞数量。

1.3.3 人 EPCs 的分离与培养 采集健康志愿者的外周血, 按 1:2 的比例加入 PBS 稀释, 用移液器缓慢地将标本移至 Histopaque 1077 淋巴细胞分离液上方, 400 \times g 离心 30 min, 取中间层单核细胞, PBS 清洗 2 遍, 加入含 10% FBS、10 ng/mL VEGF、10 ng/mL bFGF 的 M199 培养液, 将标本稀释成 5 \times 10⁶/mL, 放入恒温孵箱(37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂)中培养, 4 d 后洗掉未贴壁细胞, 每 3 天换 1 次培养液, 于第 7 天再进行后续试验。

1.3.4 人 EPCs 增殖能力评价 采用 MTT 比色评价人 EPCs 的增殖能力。将人 EPCs 以每孔 1 \times 10³ 个细胞的密度种于 96 孔板, 加入 NE 或其他药物干预 72 h, 加入 MTT 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 h, 酶标仪检测反应细胞数量 450 nm 波长处的吸光度值(A₄₅₀值)。

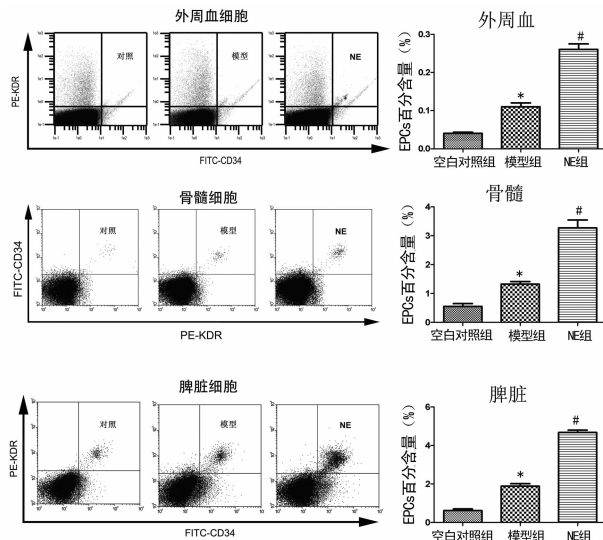
1.3.5 人 EPCs 迁移能力检测 采用 Transwell 小室评价人 EPCs 的迁移能力。将人 EPCs 以每孔 2 \times 10⁴ 个细胞的密度种植于 24 孔板 Transwell 小室的上室, 下室加入含 50 $\mu\text{g}/\text{L}$ VEGF 的培养液, 以未加入药物干预的细胞为对照组, 1 h 后将不同浓度 NE 加于上室, 恒温孵箱(37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂)孵育 24 h, 4% 多聚甲醛固定细胞, 棉签擦去隔膜上侧的细胞, 浸入结晶紫染色 3 min, 清水洗去结晶紫, 在高倍光学显微镜(\times 100)下计数隔膜下侧 6 个随机视野的人 EPCs 数量。

1.3.6 蛋白质印迹法(Western blotting)检测 在药物干预后的人 EPCs 中加入蛋白提取裂解液, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 裂解细胞 30 min, 低温离心机(4 $^{\circ}\text{C}$ 8 000 \times g)离心 30 min, 去除沉淀, 加入上样缓冲液, 煮沸 10 min, 于 12% 十二烷基硫酸钠(SDS)-聚丙烯酰胺凝胶中电泳, 转入硝酸纤维素膜, 5% 无脂牛奶封闭 1 h, 分别加入鼠抗人磷酸化 eNOS IgG 抗体、鼠抗人 eNOS IgG 抗体、鼠抗人磷酸化 Akt IgG 抗体和鼠抗人 Akt IgG 抗体, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 12 h, 用含吐温-20 的 Tris 缓冲生理盐水(TBST)洗 3 次, 羊抗鼠二抗室温下孵育 1 h, 电化学发光液(ECM)显影, 采用 Image-pro plus6.0 软件分析信号强度。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行数据处理与统计分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 SNK 法; 以 $\alpha=0.05$ 为检验水平, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠骨髓、外周血及脾脏 EPCs 含量比较 采用流式细胞仪检测外周血、骨髓和脾脏中 EPCs 的表达, 结果显示: 模型组与空白对照组比较, 外周血 [(0.110 \pm 0.028)% vs. (0.040 \pm 0.009)%]、骨髓 [(1.320 \pm 0.256)% vs. (0.550 \pm 0.172)%] 和脾脏 [(1.880 \pm 0.0381)% vs. (0.610 \pm 0.256%)] EPCs 的数量均上升, 差异均有统计学意义 ($P<0.01$); NE 组与模型组比较, 外周血 [(0.261 \pm 0.041)% vs. (0.110 \pm 0.028)%]、骨髓 [(3.271 \pm 0.772)% vs. (1.320 \pm 0.256%)] 和脾脏 [(4.671 \pm 0.345% vs. (1.880 \pm 0.0381%)] EPCs 的数量也均上升, 差异均有统计学意义 ($P<0.01$), 表明 NE 进一步促进 EPCs 动员。见图 1。

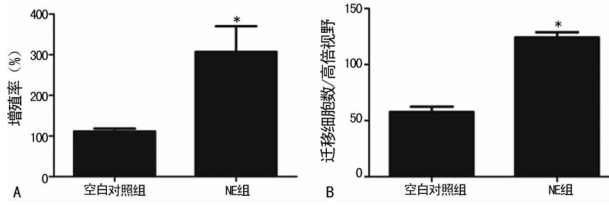


*: $P<0.01$, 与空白对照组比较; #: $P<0.01$, 与模型组比较。

图 1 骨髓、外周血和脾脏的 EPCs 流式细胞图像及各组 EPCs 含量比较

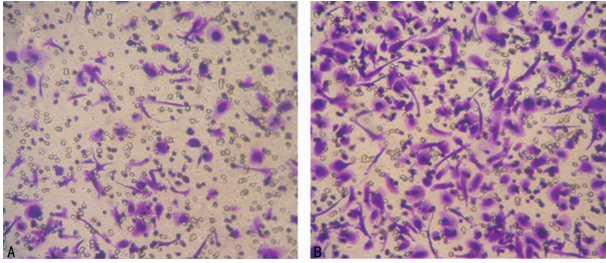
2.2 NE 刺激 EPCs 的增殖和迁移 于培养至第 8 天的人 EPCs 培养液中加入 NE, 使其浓度为 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 3 d 后 MTT 法检测细胞数量, 结果显示: NE 组人 EPCs 细胞增殖率为对照组的 (307.1 \pm 97.7)%, 差异有统计学意义 ($P<0.01$), 见图 2A。取培养至第 8 天的人 EPCs 进行迁移试验, 在上室中加入 NE, 使其浓度为 1 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 24 h 后取出 Transwell 小室, 镜下计数隔膜下每个高倍视野(\times 100)的 EPCs 数量, 结果显示: NE 组与对照组比较, 每高倍视野 EPCs 计数明显增加 [(124 \pm 12) vs. (57 \pm 14)], 差异有统计学意义 ($P<0.01$), 见图 2B。结

晶紫染色迁移入下室的 EPCs 图像见图 3。



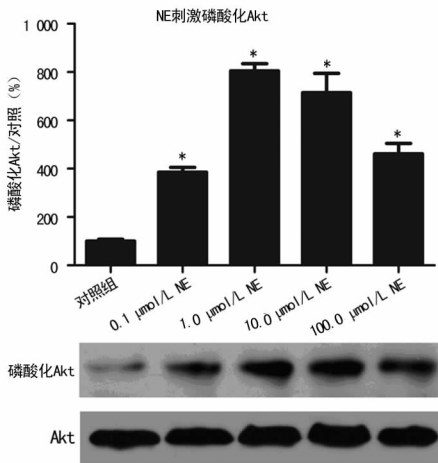
A: 增殖能力; B: 迁移能力; *: $P < 0.01$, 与空白对照组比较。

图2 对照组与 NE 组人 EPCs 的增殖与迁移能力比较



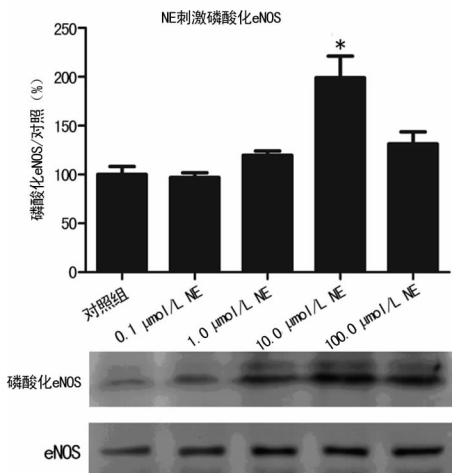
A: 对照组; B: NE 组。

图3 迁移入下室的 EPCs 图像 (结晶紫染色 $\times 100$)



*: $P < 0.01$, 与对照组比较。

图4 不同浓度 NE 激活 Akt 比较



*: $P < 0.01$, 与对照组比较。

图5 不同浓度 NE 激活 eNOS 比较

2.3 Akt-eNOS 信号通路的激活 Western blotting 检测结果显示: NE 能够剂量依赖性地激活 Akt-eNOS 信号通路。在人

EPCs 的培养液中分别加入浓度 0.1、1.0、10.0 和 100.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 NE, 结果显示: 以上各 NE 浓度下 EPCs 的磷酸化 Akt 相对于对照组分别为 $(385.7 \pm 58.5)\%$ 、 $(756.6 \pm 123.9)\%$ 、 $(638.2 \pm 271.9)\%$ 和 $(493.3 \pm 41.4)\%$, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。见图 4。磷酸化 eNOS 相对于对照组分别为 $(97.0 \pm 14.7)\%$ 、 $(119.7 \pm 11.8)\%$ 、 $(199.0 \pm 49.7)\%$ 和 $(131.3 \pm 30.2)\%$, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。见图 5。

3 讨论

本研究结果显示, NE 能够显著地刺激 EPCs 的增殖、迁移能力, 促进肢体缺血小鼠骨髓中 EPCs 的动员, 增加外周血 EPCs 水平及 EPCs 在脾脏的沉积, 且 NE 主要通过 Akt-eNOS 信号通路介导这种作用。

EPCs 现已经被用于创伤修复、缺血性疾病的治疗和组织工程学领域^[7]。有研究报道, 接受人 EPCs 治疗的小鼠下肢血流量明显增加, 缺血肢体成活率明显提高^[8]。用动物缺血模型行自体骨髓 EPCs 体外扩增回输, 发现缺血部位再灌注和侧支循环增加。EPCs 对缺血性心血管疾病有明显的治疗作用, 以骨髓扩增 EPCs 对心肌梗死患者做冠状动脉内注射, 对比发现骨髓 EPCs 治疗后心功能明显改善^[9]。

在生理条件下, 外周循环中 EPCs 含量非常少, 仅占全部单核细胞的 0.03%~0.06%。骨髓是 EPCs 的主要来源地, 在各种血管损伤、缺血、烧伤、创伤或者细胞因子刺激的作用下, EPCs 可从骨髓中动员进入血液循环系统, 迁移到损伤内皮处, 修复损伤血管, 或者新生出滋养血管。EPCs 的动员及功能受到如高血压、吸烟、高血脂和高血糖等多种因素影响^[10]。既往认为, 局部缺血是介导 EPCs 动员的主要信号。而现在的研究发现, 除此之外, 许多生理激素如雌激素、促红细胞生成素等也参与调节 EPCs 的动员及其功能。最近的研究发现, 骨髓中的自主神经末梢在骨髓各种细胞功能的调节中发挥着非常重要的作用。如 D2 受体被多巴胺激活后能起到抑制 EPCs 动员的作用^[11]。既往研究还发现, NE 能够显著增加体外培养的骨髓造血细胞的增殖率和细胞内 RNA 的合成^[12]。而本研究发现, 组织中生理浓度的 NE (0.023~7.3 $\mu\text{mol/L}$) 能够明显刺激 EPCs 的增殖和迁移能力。

NE 在体内的分泌呈周期性变化, 是人体昼夜节律调节最重要的物质之一^[13]。而最近的研究发现, EPCs 在体内分泌的周期性和高峰与交感神经活动的周期和高峰严格吻合^[14]。这说明 NE 调节 EPCs 的动员可能是人体规律性的全身修复活动的一部分。并且, 在缺血、烧伤、创伤等许多疾病情况下, 交感神经同样被显著地激活。与此同时, EPCs 的动员也明显增加。因此, 无论在生理还是病理状态下, NE 均是 EPCs 动员的重要调节因子。这可能也是创伤和缺血性疾病时, EPCs 可迅速动员的机制之一。

EPCs 内有多条活跃的信号传递通道。既往研究发现, NE 能够通过激活 Akt 信号分子和 eNOS 信号分子, 促进一氧化氮 (NO) 的产生, 进一步激活造血细胞的增殖和迁移能力^[15]。本研究发现, NE 主要通过 Akt-eNOS 信号分子刺激人 EPCs 的增殖和迁移能力, 并进一步促进肢体缺血小鼠 EPCs 的动员。许多在棕色脂肪细胞和内皮细胞中的研究发现, NE 主要通过 $\alpha 1$ 和 $\beta 3$ 肾上腺受体激活细胞内的 Akt-eNOS 信号通路。而 NE 是通过何种受体激活 EPCs, 还需要进一步的研究确定。

综上所述, 本研究结果提示: NE 能够通过 Akt-eNOS 信号通路调节 EPCs 的增殖和迁移能力, 以及 EPCs 在骨髓中的动员, 增加外周血 EPCs 的数量和在靶器官的沉积, 为进一步揭

示神经系统调节血管修复细胞的功能提供了理论依据。

参考文献

- [1] Katayama Y, Battista M, Kao WM, et al. Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow[J]. *Cell*, 2006, 124(2): 407-421.
- [2] Penn A, Mohr A, Shah S, et al. Dose-response relationship between norepinephrine and erythropoiesis: evidence for a critical threshold[J]. *J Surg Res*, 2010, 163(2): 85-90.
- [3] Tang Y, Vater C, Jacobi A, et al. Salidroside exerts angiogenic and cytoprotective effects on human bone marrow-derived endothelial progenitor cells via Akt/mTOR/p70S6K and MAPK signalling pathways[J]. *Br J Pharmacol*, 2014, 171(9): 2440-2456.
- [4] Tilan J, Kitlinska J. Sympathetic Neurotransmitters and Tumor Angiogenesis-Link between Stress and Cancer Progression[J]. *J Oncol*, 2010(2010): 539706.
- [5] Udo H, Hamasu K, Furuse M, et al. VEGF-induced antidepressant effects involve modulation of norepinephrine and serotonin systems[J]. *Behav Brain Res*, 2014, 275(9): 107-113.
- [6] Spiegel A, Shvritiel S, Kalinkovich A, et al. Catecholaminergic neurotransmitters regulate migration and repopulation of immature human CD34⁺ cells through Wnt signaling[J]. *Nat Immunol*, 2007, 8(10): 1123-1131.
- [7] Herrmann M, Verrier S, Alini M. Strategies to Stimulate Mobilization and Homing of Endogenous Stem and Progenitor Cells for Bone Tissue Repair[J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2015(3): 79.
- [8] Koiwaya H, Sasaki K, Ueno T, et al. Augmented neovascularization with magnetized endothelial progenitor cells in rats with hind-limb ischemia[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2011, 51(1): 33-40.
- [9] Gaffey AC, Chen MH, Venkataraman CM, et al. Injectable shear-thinning hydrogels used to deliver endothelial progenitor cells, enhance cell engraftment, and improve ischemic myocardium[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2015, 150(5): 1268-1277.
- [10] Umemura T, Soga J, Hidaka T, et al. Aging and hypertension are independent risk factors for reduced number of circulating endothelial progenitor cells[J]. *Am J Hypertens*, 2008, 21(11): 1203-1209.
- [11] Henrich D, Hahn P, Wahl M, et al. Serum derived from multiple trauma patients promotes the differentiation of endothelial progenitor cells in vitro: possible role of transforming growth factor-beta1 and vascular endothelial growth factor165[J]. *Shock*, 2004, 21(1): 13-16.
- [12] Récalde A, Richart A, Guérin C, et al. Sympathetic nervous system regulates bone marrow-derived cell egress through endothelial nitric oxide synthase activation: role in postischemic tissue remodeling [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32(3): 643-653.
- [13] Di Stefano R, Barsotti M, Felice F, et al. Smoking and endothelial progenitor cells: a revision of literature[J]. *Curr Pharm Des*, 2010, 16(23): 2559-2566.
- [14] Cheng J, Cui R, Chen C, et al. Oxidized low-density lipoprotein stimulates p53-dependent activation of proapoptotic Bax leading to apoptosis of differentiated endothelial progenitor cells[J]. *Endocrinology*, 2007, 148(5): 2085-2094.
- [15] Chakroborty D, Sarkar C, Basu B, et al. Catecholamines regulate tumor angiogenesis [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(9): 3727-3730.
- (收稿日期: 2015-12-28 修回日期: 2016-02-26)
- (上接第 2595 页)
- mice[J]. *BMC Pulm Med*, 2014, 14(79): 79.
- [6] Gaffey K, Reynolds S, Plumb J, et al. Increased phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase in COPD lungs[J]. *Eur Respir J*, 2013, 42(1): 28-41.
- [7] Liu HC, Lu MC, Lin YC, et al. Differences in IL-8 in serum and exhaled breath condensate from patients with exacerbated COPD or asthma attacks[J]. *J Formos Med Assoc*, 2014, 113(12): 908-914.
- [8] 王彦霞, 陈莹, 李庆威, 等. COPD 患者外周血单个核细胞中 TNF- α 、IL-8 和 IL-10 的测定及意义[J]. *河北医药*, 2012, 34(3): 335-337.
- [9] Wu H, Yang S, Wu X, et al. Interleukin-33/ST2 signaling promotes production of interleukin-6 and interleukin-8 in systemic inflammation in cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease mice[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 450(1): 110-116.
- [10] Huang C, Xie M, He X, et al. Activity of sputum p38 MAPK is correlated with airway inflammation and reduced FEV1 in COPD patients[J]. *Med Sci Monit*, 2013, 19(21): 1229-1235.
- [11] 闫莉, 刘春霞, 魏欣, 等. 谷氨酰胺对慢性阻塞性肺病患者营养免疫调节和抗氧化治疗的作用[J]. *中国老年学杂志*, 2010, 30(16): 2277-2279.
- [12] Singleton KD, Wischmeyer PE. Glutamine attenuates inflammation and NF-kappa B activation via Cullin-1 deneddylation[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 373(3): 445-449.
- [13] Lee CH, Kim HK, Kim JM, et al. Glutamine suppresses airway neutrophilia by blocking cytosolic phospholipase A(2) via an induction of MAPK phosphatase-1[J]. *J Immunol*, 2012, 189(11): 5139-5146.
- [14] 周凌燕, 黄美健, 汤晓燕, 等. 谷氨酰胺对慢性阻塞性肺病患者外周血单个核细胞中核因子 κ B 及肿瘤坏死因子 α 表达的影响[J]. *中国新药与临床杂志*, 2013, 32(11): 918-920.
- (收稿日期: 2016-01-14 修回日期: 2016-03-27)