

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.02.005

p38 MAPK 信号通路在 TLR4 促进胰腺癌血管生成中的作用*

孙运良¹,马建霞^{2△},满晓华³,吴红玉³

(1. 江苏省连云港市赣榆区人民医院消化内科 222100;2. 上海复旦大学附属华东医院
消化内科,上海 200338;3. 第二军医大学附属长海医院消化内科,上海 200433)

[摘要] **目的** 探讨 Toll 样受体-4(TLR4)和 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)信号通路在胰腺癌血管生成中的作用。**方法** 以脂多糖(LPS)、TLR4-siRNA 及 p38 MAPK 信号通路阻断剂 SB203580 分别作用于体外培养的胰腺癌 PANC-1 细胞,Western blot 检测 TLR4、血管内皮生长因子(VEGF)、磷酸化 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p-p38)蛋白表达。收集各种因素处理后的 PANC-1 细胞培养液,观察其对入脐静脉内皮细胞(HUVECs)增殖、迁移和管腔形成的影响。**结果** LPS 组的 HUVECs 增殖率、迁移数目和管腔形成个数分别为(139.2±12.6)%、48.1±9.1 和 47.8±9.6,均显著高于对照组($P<0.05$)。TLR4-siRNA 组的 HUVECs 增殖率、迁移数目和管腔形成个数分别为(60.2±8.7)%、31.3±4.5 和 17.2±3.3,均显著低于对照组($P<0.01$);SB203580 组的 HUVECs 增殖率[(79.6±8.9)%]、迁移数目(21.6±4.3)和管腔形成个数(23.5±4.3)均较对照组显著减少($P<0.05$);且 TLR4-siRNA+LPS、SB203580+LPS 组的 HUVECs 增殖率、迁移数目和管腔形成个数均分别显著低于 LPS 组($P<0.01$)。与对照组相比,LPS 组 VEGF、p-p38 蛋白表达均明显增加,TLR4-siRNA 组、SB203580 组 TLR4、VEGF、p-p38 蛋白表达明显减少;且 TLR4-siRNA+LPS 组、SB203580+LPS 组 VEGF、p-p38 表达较 LPS 组明显减少。**结论** TLR4 可促进胰腺癌的血管生成,其机制与激活 p38 MAPK 信号通路、促进 VEGF 表达有关。

[关键词] Toll 样受体 4;胰腺肿瘤;血管生成;p38 丝裂原活化蛋白激酶信号通路;血管内皮生长因子

[中图分类号] R735.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2017)02-0161-04

Role of p38 MAPK signal pathway in TLR4 promoted angiogenesis of pancreatic cancer*

Sun Yunliang¹,Ma Jianxia^{2△},Man Xiaohua³,Wu Hongyu³

(1. Department of Gastroenterology,Ganyu District People's Hospital,Lianyungang,Jiangsu
222100,China;2. Department of Gastroenterology,Affiliated Huadong Hospital,Fudan
University,Shanghai 200338,China;3. Department of Gastroenterology,
Affiliated Changhai Hospital,Second Military Medical University,Shanghai 200433,China)

[Abstract] **Objective** To investigate the role of Toll like receptor-4 (TLR4) and p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) signaling pathway in the angiogenesis of pancreatic neoplasms. **Methods** The in vitro cultured pancreatic cancer PANC-1 cells were treated with lipopolysaccharide (LPS),TLR4-siRNA and p38 MAPK signal pathway inhibitor SB203580. TLR4,vascular endothelial growth factor (VEGF), p-p38 protein expression of PANC-1 cells were detected by Western blot. The culture supernatants of PANC-1 cells after various factors treatment were collected for observing their effects on the proliferation,migration and tube formation of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). **Results** The proliferation rate,number of migration and tube formation of HUVECs in the LPS group were (139.2±12.6)%,48.1±9.1 and 47.8±9.6,respectively,which were significantly higher than those in the control group ($P<0.05$). The proliferation rate,number of migration and tube formation of HUVECs in the TLR4-siRNA group were (60.2±8.7)%,31.3±4.5 and 17.2±3.3,respectively,which were significantly lower than those in the control group ($P<0.01$). The proliferation rate [(79.6±8.9)],number of migration(21.6±4.3) and tube formation (23.5±4.3) of HUVECs in the SB203580 group were significantly lower than those in control group($P<0.05$),moreover the proliferation rate,number of migration and tube formation of HUVECs in the TLR4-siRNA+LPS and SB203580+LPS groups were significantly lower than those in the LPS group($P<0.01$). Compared with the control group,VEGF and p-p38 protein expression in the LPS group were significantly increased,and TLR4,VEGF and p-p38 protein expression in the TLR4-siRNA and SB203580 groups were decreased;moreover VEGF and p-p38 protein expression in the TLR4-siRNA+LPS and SB203580+LPS groups were significantly decreased compared with the LPS group. **Conclusion** TLR4 may promote the angiogenesis in pancreatic cancer,its mechanism is related with activating the p38 MAPK signaling pathway and promoting VEGF expression.

[Key words] Toll-like receptor 4;pancreatic neoplasms;angiogenesis;p38 mitogen-activated protein kinases signaling pathway;vascular endothelial growth factor

* 基金项目:连云港市卫生局科研项目(1427);江苏省卫生厅科研项目(Y201420)。 作者简介:孙运良(1975—),副主任医师,博士,主要从事胰腺癌的发病机制与生物治疗方面研究。 △ 通信作者,Email:yz_mjx@163.com。

Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 是近年来发现的 I 型跨膜蛋白质。其中, TLR4 是最早发现的, 同时也是研究最为广泛的 TLRs 家族成员, 主要识别革兰阴性细菌细胞壁成分脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS)。近年来研究表明, TLR4 在肿瘤细胞呈高表达, 与多种肿瘤的发生、发展密切相关, 但其促肿瘤的确切机制尚未完全阐明^[1-3]。血管生成已被证实是肿瘤的生长、侵袭和转移中发挥重要作用^[4-5]。本课题组前期研究发现, TLR4 在胰腺癌组织中呈高表达, 且高表达的 TLR4 与胰腺癌的血管生成有关^[2], 但 TLR4 促血管生成的机制有待于进一步明确。血管内皮生长因子 (VEGF) 是目前已知的最重要的促血管生成因子, 在诸多调控 VEGF 表达的信号通路中, p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 MAPK) 信号通路已被证实具有重要的作用^[6-7]。本研究以 LPS、TLR4-siRNA 及 p38 MAPK 信号通路阻断剂 SB203580 分别作用于体外培养的胰腺癌 PANC-1 细胞, 收集各组细胞培养液作用于人脐静脉血管内皮细胞 (HUVECs), 观察 HUVECs 增殖、迁移及管腔形成的变化, 分析 TLR4 对 p38 MAPK 信号通路及 VEGF 表达影响, 探讨 TLR4 促胰腺癌血管生成的作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 材料 人胰腺癌细胞株 PANC-1 购自美国 ATCC 公司; HUVECs 购自中国科学院上海细胞生物学研究所; TLR4-siRNA (上游: 5'-CUU UAU CCA ACC AGG UGC AUU UU-3'; 下游: 5'-AAU GCA CCU GGU UGG AUA AAG UU-3') 由上海吉玛生物技术有限公司合成; LPS 和 SB203580 均为 Sigma 公司产品; 兔抗人 TLR4、VEGF 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司; 鼠抗人磷酸化 P38 丝裂原活化蛋白激酶 (p-p38) 的单克隆抗体和 p38 的多克隆抗体均购自 Cell Signaling 公司; Transwell 小室购自 Coster 公司; Matrigel 购自 BD 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 PANC-1 细胞和 HUVECs 在含有 10% 胎牛血清 (FBS) 的 DMEM 培养液中, 37 °C, 5% CO₂ 条件下培养, 培养液中含青霉素、链霉素各 100 U/mL。将 PANC-1 细胞以每孔 1×10^6 的量加入 6 孔板, 待细胞贴壁后, 进行下列的分组实验。对照组: 不加任何处理因素; LPS 组: 加入 1 μ g/mL 的 LPS 处理 24 h; TLR4-siRNA 组: 加入 100 pmol/mL 的 TLR4-siRNA 处理 4 h; TLR4-siRNA + LPS 组: 加入 100 pmol/mL 的 TLR4-siRNA 处理 4 h 后继续加入 1 μ g/mL 的 LPS 处理 24 h; SB203580 组: 加入 20 μ mol/L 的 SB203580 处理 2 h; SB203580 + LPS 组: 加入 20 μ mol/L 的 SB203580 处理 2 h 后继续加入 1 μ g/mL 的 LPS 处理 24 h。收集各组细胞培养液上清液分别作用于体外培养的 HUVECs。

1.2.2 TLR4-siRNA 转染 将 PANC-1 细胞以 1×10^6 /孔的量加入 6 孔板, 待细胞贴壁后, 弃去培养液, 进行后续的 TLR4-siRNA 转染实验。具体转染步骤如下: 将 100 pmol TLR4-siRNA 加入到 100 μ L 的无血清的 DMEM 培养基中和混匀; 用 100 μ L 无血清的 DMEM 稀释 5 μ L lipofectamin2000 试剂, 轻轻混匀, 室温放置 5 min; 将稀释好的 TLR4-siRNA 和 lipofectamin2000 试剂混合, 轻柔混匀, 室温放置 20 min, 以形成 TLR4-siRNA/lipofectamin 复合物; 将 6 孔板的每孔中加入上述 200 μ L TLR4-siRNA/lipofectamin 复合物和 800 μ L 无血清的 DMEM 培养基, 继续培养 4 h 后, 弃去培养液, 加入或不加

入 LPS 继续培养 24 h。

1.2.3 四甲基噻唑蓝 (MTT) 法检测 HUVECs 增殖 将 HUVECs 以 5×10^3 /孔的量加入 96 孔板, 待细胞贴壁后, 更换为各组 PANC-1 细胞培养液, 37 °C, 5% CO₂ 条件下继续培养 48 h 后, 每孔加入 20 μ L MTT 溶液 (5 mg/mL)。继续培养 4 h 后吸去孔内培养液, 每孔加入 150 μ L 二甲亚砜 (DMSO), 置摇床上低速振荡 10 min, 使结晶物充分溶解, 在酶联免疫检测仪波长 570 nm 处测量各孔的吸光度值 (A 值)。细胞增殖率 = (实验孔 A 值/对照孔 A 值) $\times 100\%$ 。

1.2.4 Transwell 小室检测 HUVECs 的迁移能力 常规培养 HUVECs, 收集细胞, 用各组 PANC-1 细胞培养液上清液将 HUVECs 备成 5×10^5 /mL 细胞悬液, 取 200 μ L 细胞悬液接种至 Transwell 上室, 在下室加入 700 μ L 含 10% FBS 的 DMEM 培养液。继续培养 24 h 后, 取出 Transwell 小室, 用棉签将小室上层的细胞擦除, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 轻轻冲洗, 晾干, 然后用 0.1% 结晶紫染色 10 min, 去除多余结晶紫染液, 普通光学显微镜下观察。每个滤膜随机选取 5 个 400 倍视野, 计数穿膜细胞数, 以穿膜细胞的数目表示 HUVECs 的迁移能力。

1.2.5 Matrigel 检测 HUVECs 的管腔形成能力 常规培养 HUVECs, 收集细胞, 用 PANC-1 细胞培养液上清重新悬浮, 以 1×10^5 /孔的量接种于预铺 Matrigel 的 24 孔板中。37 °C, 5% CO₂ 条件下继续培养 24 h 后, 倒置显微镜下观察。选取 3 个视野计算所形成管腔个数的平均值。

1.2.6 Western blot 检测 PANC-1 细胞 TLR4、p38、p-p38 和 VEGF 蛋白表达 用 RIPA 裂解液制备细胞总蛋白, 蛋白分析系统测定蛋白浓度, 上样于 20% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳, 电转移到硝酸纤维素膜。室温下用含 5% 脱脂奶粉的 1 \times TBS 封膜 2 h。加入 TLR4、p38、p-p38、VEGF 抗体, 4 °C 孵育过夜, 洗膜后加入相应的辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗, 室温孵育 2 h, 电化学发光 (ECL) 显影。结果用凝胶图像软件分析系统对胶片扫描, 与内参照 β -actin 进行比较。

1.3 统计学处理 用 SPSS 11.0 统计软件包进行分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

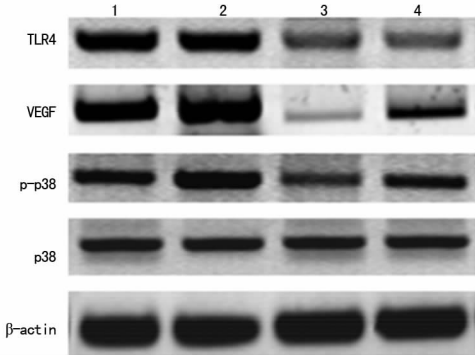
2 结果

2.1 TLR4 对胰腺癌血管生成的影响 LPS 组的 HUVECs 增殖率、迁移数目和管腔形成个数分别为 (139.2 \pm 12.6)%、48.1 \pm 9.1 和 47.8 \pm 9.6, 均显著高于对照组的 (99.5 \pm 9.3)%、40.3 \pm 6.7 和 31.5 \pm 5.3 ($P < 0.05$)。而 TLR4-siRNA 组的 HUVECs 增殖率、迁移数目和管腔形成个数分别为 (60.2 \pm 8.7)%、31.3 \pm 4.5 和 17.2 \pm 3.3, 均显著低于对照组 ($P < 0.01$); 而 TLR4-siRNA + LPS 组的 HUVECs 增殖率、迁移数目和管腔形成个数分别为 (88.8 \pm 9.1)%、35.6 \pm 5.2 和 26.8 \pm 5.1, 均显著低于 LPS 组 ($P < 0.01$), 经 TLR4-siRNA 预处理后, LPS 促进 HUVECs 增殖、迁移和管腔形成的能力明显下降。

2.2 p38 MAPK 信号通路在 TLR4 促胰腺癌血管生成中的作用 与对照组相比, SB203580 组的 HUVECs 增殖率 [(79.6 \pm 8.9)%]、迁移数目 (21.6 \pm 4.3) 和管腔形成个数 (23.5 \pm 4.3) 均显著减少 ($P < 0.05$); 而 SB203580 + LPS 组的 HUVECs 增

殖率 $[(109.7 \pm 12.6)\%]$ 、迁移数目 (31.8 ± 5.7) 和管腔形成个数 (29.2 ± 5.3) 均显著低于 LPS 组 $(P < 0.05)$ ，经 SB203580 阻断 p38 MAPK 信号通路后，LPS 促进 HUVECs 增殖、迁移和管腔形成的能力明显下降。

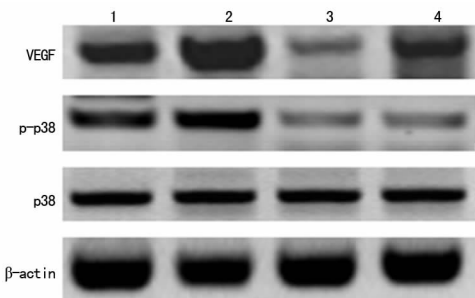
2.3 TLR4 对 PANC-1 细胞 VEGF 表达的影响 与对照组相比，经 LPS 作用后，尽管 PANC-1 细胞 TLR4 蛋白表达无明显变化，但 VEGF、p-p38 蛋白表达均明显增加，而 TLR4-siRNA 可明显抑制 PANC-1 细胞 TLR4、VEGF、p-p38 蛋白表达；且 TLR4-siRNA 可显著抑制 LPS 对 VEGF、p-p38 表达的诱导作用，见图 1。



1: 对照组; 2: LPS 组; 3: TLR4-siRNA 组; 4: TLR4-siRNA + LPS 组。

图 1 LPS、TLR4-siRNA 对 PANC-1 细胞 TLR4、VEGF、p38、p-p38 蛋白表达的影响

2.4 p38 MAPK 信号通路在 TLR4 促进 PANC-1 细胞表达 VEGF 中的作用 为了进一步验证 TLR4 蛋白可通过激活 p38 MAPK 通路促进 VEGF 表达，本研究分别以 LPS 和 SB203580 作用于 PANC-1 细胞。Western blot 的结果显示，经 SB203580 阻断 p38 MAPK 通路后，PANC-1 细胞 VEGF、p-p38 蛋白表达均较对照组明显下降，且阻断 p38 MAPK 通路可明显逆转 LPS 所诱导的 VEGF、p-p38 表达，见图 2。



1: 对照组; 2: LPS 组; 3: SB203580 组; 4: SB203580 + LPS 组。

图 2 LPS、SB203580 对 PANC-1 细胞 VEGF、p38、p-p38 蛋白表达的影响

3 讨 论

TLR4 主要表达于与宿主防御功能有关的免疫细胞和内皮细胞，这样可以使 TLR4 更为方便地识别胞外细菌及其配体，诱导产生一系列的炎性介质从而产生强有力的炎症反应^[8]。近年来研究发现，TLR4 还在多种肿瘤细胞呈高表达，具有抑制肿瘤细胞凋亡，促进肿瘤细胞增殖、黏附、转移，以及免疫逃逸的作用^[1-3,9]。已有的研究证实，TLR4 在胰腺癌组织中高表达，且高表达的 TLR4 与胰腺癌的血管生成密切相关，

提示 TLR4 在胰腺癌的发生与发展中起着重要的作用^[2,10]。胰腺癌的生长、浸润和转移必须依赖肿瘤血管生成，抗血管生成已成为胰腺癌治疗研究的一个重要领域^[11]。本研究发现，经 LPS 作用后的 PANC-1 细胞培养液可显著促进 HUVECs 细胞的增殖、迁移和管腔形成，而经 TLR4-siRNA 作用后的 PANC-1 细胞培养液可明显抑制 HUVECs 细胞的增殖、迁移和管腔形成，表明 TLR4 具有促进血管生成的作用。VEGF 是目前发现的最为重要的促血管生成因子之一，在肿瘤的发展过程中起着重要的作用^[12]。本研究发现，经 LPS 作用后，PANC-1 细胞 VEGF 蛋白表达明显增加，而 TLR4-siRNA 可明显抑制 VEGF 蛋白表达，表明 TLR4 具有诱导 VEGF 表达的作用。Riddell 等^[13]通过对前列腺癌的研究也发现，TLR4 具有调控 VEGF 表达的能力，可促进肿瘤血管的生成，然而 TLR4 促进 VEGF 表达的机制尚有待于进一步明确。

p38 MAPK 是丝裂原活化蛋白激酶家族成员之一，广泛存在于细胞中，是参与细胞生长、增殖、分化调节的重要信号转导通路。目前已证实，p38 MAPK 通路在多种肿瘤细胞内呈持续激活状态，持续激活的 p38 MAPK 通路可诱导 VEGF 及 IL-8 等细胞因子的产生，从而在促进肿瘤血管生成过程发挥重要的作用^[6-7]。本研究也发现，阻断 p38 MAPK 通路后，PANC-1 细胞 VEGF 蛋白表达显著下降，且培养液对 HUVECs 的增殖、迁移及管腔形成均有明显的抑制作用，同样证实 p38 MAPK 通路可通过诱导 VEGF 表达，促进肿瘤血管生成。研究表明，TLR4 可促进 p38 蛋白的磷酸化，激活 p38 MAPK 通路，促进肿瘤细胞的生长；而使用 RNA 干扰技术沉默 TLR4 基因后，可抑制 p38 MAPK 通路，促进肿瘤细胞的凋亡^[14-15]。本研究发现，LPS 可促进 PANC-1 细胞 p-p38 的表达，而 TLR4-siRNA 在抑制 TLR4 表达的同时可抑制 p-p38 的表达，表明 TLR4 具有激活胰腺癌细胞 p38 MAPK 通路的作用。进一步的研究发现，阻断 p38 MAPK 通路可明显阻断 LPS 对 PANC-1 细胞 VEGF 表达的诱导作用，并显著抑制 LPS 作用后 PANC-1 细胞培养液对 HUVECs 增殖、迁移和管腔形成的促进能力。这些结果表明，激活 p38 MAPK 通路是 TLR4 诱导 VEGF 的表达，从而促进胰腺癌的血管生成的重要机制。

胰腺癌是严重危害人类健康的恶性肿瘤，阐明其发病机制并寻找有效的治疗靶点是目前迫切需要解决的重要课题。本研究表明，TLR4 具有促进胰腺癌血管生成的作用，其机制与激活 p38 MAPK 信号通路，诱导 VEGF 表达有关。但胰腺癌的发生、发展涉及多方面的复杂因素，TLR4 的异常表达及其促血管生成可能只是其中的一种形式，其确切的分子机制尚有待于进一步研究。

参考文献

[1] Fu HY, Li C, Yang W, et al. FOXP3 and TLR4 protein expression are correlated in non-small cell lung cancer: implications for tumor progression and escape[J]. Acta Histochem, 2013, 115(2): 151-157.
[2] 满晓华, 孙运良, 龚燕芳, 等. Toll 样受体 4 在胰腺癌组织中的表达及其与肿瘤血管生成的关系[J]. 中华胰腺病杂志, 2012, 12(3): 167-169.

- [3] Yuan X,Zhou Y,Wang W,et al. Activation of TLR4 signaling promotes gastric cancer progression by inducing mitochondrial ROS production[J]. *Cell Death Dis*,2013,4(9):1-10.
- [4] Benazzi C, Al-Dissi A, Chau CH, et al. Angiogenesis in spontaneous tumors and implications for comparative tumor biology[J]. *Sci World J*,2014;919570.
- [5] Shojaei F. Anti-angiogenesis therapy in cancer: current challenges and future perspectives[J]. *Cancer Lett*,2012,320(2):130-137.
- [6] Liu N, Wu Q, Wang Y, et al. Helicobacter pylori promotes VEGF expression via the p38 MAPK Mediated COX2 PGE2 pathway in MKN45 cells[J]. *Mol Med Rep*,2014,10(4):2123-2129.
- [7] Tate CM, Blosser W, Wyss L, et al. LY2228820 dimesylate, a selective inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase, reduces angiogenic endothelial cord formation in vitro and in vivo[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(9): 6743-6753.
- [8] Liaunardy-Jopeace A, Gay NJ. Molecular and cellular regulation of toll-like receptor-4 activity induced by lipopolysaccharide ligands[J]. *Front Immunol*,2014(5):473.
- [9] Tang X, Zhu Y. TLR4 signaling promotes immune escape of human colon cancer cells by inducing immunosuppressive cytokines and apoptosis resistance[J]. *Oncol Res*, 2012,20(1):15-24.
- [10] 孙运良, 满晓华, 王丽华, 等. Toll 样受体-4 与胰腺癌侵袭和转移的关系[J]. *中国癌症杂志*, 2012, 22(7): 522-527.
- [11] Silvestris N, Gnoni A, Brunetti AE, et al. Target therapies in pancreatic carcinoma[J]. *Curr Med Chem*, 2014, 21(8):948-965.
- [12] Matsumoto K, Ema M. Roles of VEGF-A signalling in development, regeneration, and tumours[J]. *J Biochem*, 2014,156(1):1-10.
- [13] Riddell JR, Bshara W, Moser MT, et al. Peroxiredoxin 1 controls prostate cancer growth through Toll-Like receptor 4-dependent regulation of tumor vasculature [J]. *Cancer Res*,2011,71(5):1637-1646.
- [14] Wang LL, Zhu R, Huang ZQ, et al. Lipopolysaccharide-induced Toll-like receptor 4 signaling in cancer cells promotes cell survival and proliferation in hepatocellular carcinoma[J]. *Dig Dis Sci*,2013,58(8):2223-2236.
- [15] Liu SL, Yang JP, Wang LA, et al. Tibia tumor-induced cancer pain involves spinal p38 mitogen-activated protein kinase activation via TLR4-dependent mechanisms [J]. *Brain Res*,2010(1346):213-223.

(收稿日期:2016-06-28 修回日期:2016-10-02)

(上接第 160 页)

- and D-galactosamine-induced liver injury improved by the administration of lactobacillus, bifidobacterium and blueberry[J]. *Dig Liver Dis*,2007,39(9):849-856.
- [11] Zeng MD, Fan JG, Lu LG, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of nonalcoholic fatty liver diseases [J]. *J Dig Dis*,2008,9(3):108-112.
- [12] Chun XP, Jie T, Xiao YW, et al. Role of interleukin-22 in liver diseases[J]. *Inflamm Res*,2014,63(7):519-525.
- [13] Chestovich PJ, Uchida Y, Chang W, et al. Interleukin-22: implications for liver ischemia-reperfusion injury [J]. *Transplantation*,2012,93(5):485-492.
- [14] Yang L, Zhang Y, Wang L, et al. Amelioration of high fat diet induced liver lipogenesis and hepatic steatosis by interleukin-22[J]. *J Hepatol*,2010,53(2):339-347.
- [15] Xiao NK, De CF, Stephanie M, et al. Hepatoprotective and anti-fibrotic functions of interleukin-22: therapeutic potential for the treatment of alcoholic liver disease[J]. *J Gastroenterol Hepatol*,2013,28(1):56-60.
- [16] Eslamparast T, Poustchi H, Zamani F, et al. Synbiotic supplementation in nonalcoholic fatty liver disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study[J]. *Am J Clin Nutr*,2014,99(3):535-542.
- [17] Fernandes I, Marques F, Freitas VD, et al. Antioxidant and anti-proliferative properties of methylated metabolites of anthocyanins[J]. *Food Chemistry*,2013,141(3):2923-2933.
- [18] 赵雪珂, 吴荣敏, 姚玉梅, 等. 蓝莓对小鼠急性酒精性脂肪肝 TNF- α -R1 和 SREBP-1c 影响的初步研究[J]. *重庆医科大学学报*, 2015, 20(3): 43-46.
- [19] 刘奕伟, 周方, 郝建新, 等. 蓝莓汁及其提取物对嗜酸乳杆菌 NCFM 体外生长的影响[J]. *中国乳品工业*, 2013, 41(2):13-16.
- [20] Branning C, Hakansson A, Ahrne S, et al. Blueberry husks and multi-strain probiotics affect clolnic fermentation in rats [J]. *Br J Nutr*,2009,101(6):859-870.
- [21] Radaeva S, Sun R, Pan HN, et al. Interleukin 22 (IL-22) plays a protective role in T cell-mediated murine hepatitis; IL-22 is a survival factor for hepatocytes via STAT3 activation[J]. *Hepatology*,2004,39(6):1332-1342.

(收稿日期:2016-07-12 修回日期:2016-09-12)