

利拉鲁肽对高脂喂养大鼠胰腺 β 细胞 ATF4/CHOP 通路的影响王平¹, 郭晓宇¹, 高宇^{2△}, 刘剑¹, 山秀杰², 张蕊², 葛晓春², 冯增斌², 李桂芳²

(1. 承德医学院, 河北承德 067000; 2. 承德医学院附属医院内分泌科 067000)

[摘要] **目的** 观察利拉鲁肽对高脂喂养大鼠胰腺 GRP78、转录活化因子 4(ATF4)、CCAAT 区/增强子结合蛋白同源蛋白(CHOP)、TRB3 蛋白和 mRNA 表达情况,探讨利拉鲁肽对高脂喂养大鼠胰腺 ATF4/CHOP 通路的影响。**方法** 将雄性 Wistar 大鼠 44 只分为对照组、高脂组、干预组 1、干预组 2,每组 11 只,对照组给予普通饮食,其余 3 组给予高脂饮食喂养 8 周后,干预组 1 给予利拉鲁肽 $100 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 皮下注射;干预组 2 给予利拉鲁肽 $200 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 皮下注射。药物干预 2 周后处死,每组取 5 只大鼠行清醒状态下高胰岛素-正葡萄糖钳夹试验计算葡萄糖输注率(GIR),测定其余大鼠空腹血糖(FBG)、空腹胰岛素(FINS)、血清游离脂肪酸(FFA)、总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)和高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C),计算胰岛 β 细胞功能指数(HOMA- β),Western blot 和 Realtime-PCR 技术检测胰腺 GRP78、ATF4、CHOP 和 TRB3 蛋白及 mRNA 的表达。**结果** 与对照组相比,高脂组 FBG、FFA、TC、FINS、TG、LDL-C 水平显著升高,HDL-C、GIR 和 HOMA- β 明显下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),与高脂组相比,干预组 2 HDL-C、GIR 和 HOMA- β 升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),其余指标明显下降;与干预组 1 相比,干预组 2 的血 FGB、FFA、TC 下降,GIR 和 HOMA- β 升高($P < 0.05$)。与对照组相比,高脂组 GRP78、ATF4、CHOP 和 TRB3 蛋白及 mRNA 的表达明显升高;与高脂组相比,干预组 1 与干预组 2 随利拉鲁肽浓度升高,GRP78、ATF4、CHOP 和 TRB3 蛋白及 mRNA 表达逐渐下降。**结论** 利拉鲁肽可呈浓度依赖性改善高脂喂养大鼠胰岛素抵抗及保护胰岛 β 细胞,其作用机制可能涉及胰腺内质网 ATF4/CHOP 通路。

[关键词] 胰岛素抗药性;内质网应激;转录活化因子-4;CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白;利拉鲁肽**[中图分类号]** R322.57**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2017)27-3755-04**Effects of liraglutide on ATF4/CHOP pathway of pancreatic beta cells in rats fed with high-fat diet**Wang Ping¹, Guo Xiaoyu¹, Gao Yu^{2△}, Liu Jian¹, Shan Xiujie², Zhang Rui², Ge Xiaochun², Feng Zengbin², Li Guifang²

(1. Chengde Medical University, Chengde, Hebei 067000, China; 2. Department of Endocrinology, Affiliated Hospital of Chengde Medical University, Chengde, Hebei 067000, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effects of liraglutide on GRP78, ATF4, CHOP and TRB3 protein and mRNA expression in rats which fed with high fat diet, and to explore the effect of liraglutide on ATF4/CHOP pathway of pancreas in rats fed with high fat diets. **Methods** Forty-four male Wistar rats were randomly divided into the control group, high fat group, intervention group 1 and intervention group 2, 11 cases in each group. The control group was fed with common food, other 3 groups were fed with high fat diet for 8 weeks. Then the intervention group 1 was given with liraglutide ($100 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) by subcutaneous injection; the intervention group 2 was given liraglutide ($200 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) by subcutaneous injection. After 2 weeks medication intervention, the rats were killed. Five rats were taken from each group and performed the hyperinsulinemic euglycemic clamp experiment under waking state for calculating the glucose infusion rate (GIR). The fasting blood glucose (FBG), fasting insulin (FINS), serum free fatty acid (FFA), total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and high density lipoprotein (HDL) were examined, and islet beta cell function index (HOMA- β) were calculated. PCR and Western blot method were used to detect the expression of pancreas GRP78, ATF4, CHOP and TRB3 protein and mRNA. **Results** Compared with the control group, the levels of FBG, FFA, TC, FINS, TG and LDL-C in the high fat group were significantly increased, the levels of HDL-C, GIR and HOMA- β were significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); compared with the high fat group, the levels of HDL-C, GIR and HOMA- β in the intervention group 2 were increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), the other indicators were significantly decreased; compared with the intervention group 1, blood FGB, FFA, TC in the intervention group 2 were decreased, while the levels of GIR and HOMA- β were increased ($P < 0.05$). Compared with the control group, expression of GRP78, ATF4, CHOP and TRB3 protein and mRNA in the high fat group were significantly increased; compared with the high fat group, the expression of GRP78, ATF4, CHOP and TRB3 protein and mRNA in the intervention group 1 and 2 were gradually decreased with the liraglutide concentration increase. **Conclusion** Liraglutide can improve insulin resistance and protect pancreatic beta cells in a concentration-dependent manner, its mechanisms may involve in the pancreatic endoplasmic reticulum ATF4/CHOP pathway.

[Key words] insulin resistance; endoplasmic reticulum stress; ATF4; CCAAT/EBP homologous protein; liraglutide

2 型糖尿病是一种进展性疾病,胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)和胰岛 β 细胞功能减退是两个主要发病机制。近年来研究发现,内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)

可促进 IR 和 β 细胞凋亡,导致胰岛功能衰竭^[1]。胰高血糖素样多肽-1(GLP-1)类似物利拉鲁肽是治疗 2 型糖尿病的新型降糖药,该药物可抑制胰腺 β 细胞凋亡,保护胰岛 β 细胞功能

并改善 IR,但具体机制不明^[2]。本实验利用利拉鲁肽对高脂喂养 IR 大鼠进行干预,观察其对 ERS 相关转录活化因子 4 (ATF4)/CCAAT 区/增强子结合蛋白同源蛋白(CHOP)通路的影响,探讨利拉鲁肽改善 IR 保护胰岛 β 细胞的可能机制,为其治疗糖尿病提供理论依据。

1 材料与方

1.1 动物与饲料 Wistar 雄性大鼠 44 只,购于北京维通利华。普通饲料组成:总热量为 337 kCal/100 g,碳水化合物 64.19%,脂肪 12.04%,蛋白质 23.77%。高脂饲料组成:总热量为 486 kCal/100 g,碳水化合物 30.01%,脂肪 53.75%,蛋白质 16.24%。普通饲料及高脂饲料购于北京科奥协力有限公司。

1.2 实验分组 大鼠适应性喂养 3 d,分为对照组、高脂组、干预组 1、干预组 2,每组 11 只。对照组给予普通饮食,高脂组、干预组 1、干预组 2 给予高脂饲料喂养,喂养 8 周后,对照组给予普通饮食+生理盐水每日皮下注射,高脂组给予高脂饮食+生理盐水每日皮下注射,干预组 1 给予高脂饮食+利拉鲁肽 100 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 皮下注射,干预组 2 给予高脂饮食+利拉鲁肽 200 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 皮下注射。药物干预 2 周后各组取 5 只大鼠行清醒状态下高胰岛素-正葡萄糖钳夹试验计算葡萄糖输注率(GIR),判定大鼠胰岛素抵抗情况。腹主动脉取血处死各组其余大鼠,快速分离胰腺组织迅速置于一 80 $^{\circ}\text{C}$ 液氮中随后转移到-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存,用于 Western blot 和 Real-time PCR 检测。

1.3 清醒状态高胰岛素-正葡萄糖钳夹试验 参照文献^[3] 进行。

1.4 血液相关指标的测定 全血标本室温放置 2 h,1 000 r/min 离心 20 min,取上清液,-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。使用全自动生化分析仪采用 FINS 法测定空腹血糖(FBG)、总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)和高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)。血清游离脂肪酸(FFA)用 ELISA 试剂盒测定(购于南京建成生物工程研究所)。

1.5 胰岛 β 细胞功能指数(HOMA- β)计算 $\text{HOMA-}\beta = 20 \times \text{FINS} / (\text{FBG} - 3.5)$ 。

1.6 Western blot 分析 将冻存的胰腺剪成小块,取 100 mg 组织加入 1 mL 蛋白裂解液,冰上裂解 30 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液,严格按照 BCA 法测定蛋白浓度。进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),每孔上样 40 μg ,样品分离后转移至 PVDF 膜,设置电压 100 V,

总电泳时间 2 h 左右。封闭、TBST 洗膜分别加入 GRP78 一抗、ATF4 一抗、CHOP 一抗、TRB3 一抗和 β -actin 一抗(购于武汉博士德生物工程有限公司)室温摇床孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次,分别加入二抗(购于武汉博士德生物工程有限公司)4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床过夜, TBST 洗膜 3 次。在暗室中, ECL 发光剂在 X 光胶片曝光。以 β -actin 为内参对照,将胶片扫描后用 Image J 软件分析。

1.7 Real-time PCR 检测 按照 Trizol 说明书从胰腺组织提取总 RNA。应用 Fast Quant RT kit 反转录试剂盒(天根生化科技有限公司)反转录合成 cDNA,反应体系 20 μL ,严格按照说明书反转录合成 cDNA,以此为模板进行 RT-PCR,以 β -actin 作为内参。每个循环 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s,68 $^{\circ}\text{C}$ 退火 15 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 15 s。利用检测到的荧光信号,得到每份标本的扩增曲线及熔点曲线,检测反应的特异性,得到各自的 Ct 值,每组均重复 3 次进行。引物由 Invitrogen 公司设计合成,引物序列如下:GRP78 上游 5'-AAC CCA GAT GAG GCT GTA GCA-3',下游 5'-ACA TCA AGC AGA ACC AGG TCA C-3';ATF4 上游 5'-GCA TCT GTA TGA GCC CTG AGT CC-3',下游 5'-CCA CGA GGA ACA CCT GGA GAA G-3';CHOP 上游 5'-CCT CGC TCT CCA GAT TCCA-3',下游 5'-CTC ATT CTC CTG CTC CTT CTC C-3';TRB3 上游 5'-TCA AGT TGC GTC GAT TTG TCT TC-3',下游 5'-CAG TCA TCA CAC AGG CAT CCT C-3'; β -actin 上游 5'-ATG CCA TCC TGC GTC TGG ACC TGG C-3',下游 5'-AGC ATT TGC GGT GCA CGA TGG AGG G-3'。得出 Ct 值通过公式 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 分析计算各目的基因相对表达量。

1.8 统计学处理 应用 SPSS19.00 软件进行统计处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间采用完全随机设计单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

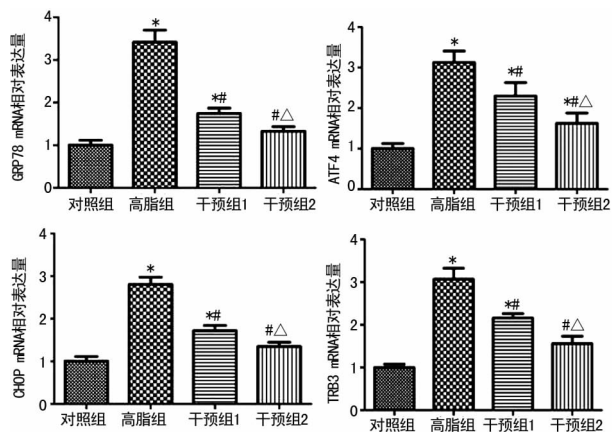
2.1 一般项目 与对照组相比,高脂组的血 FBG、FFA、TC、TG、FINS、LDL-C 均显著升高,HDL-C、HOMA- β 和 GIR 明显下降,差异有统计学意义($P < 0.01$);与高脂组相比,干预组 2 血 FBG、FFA、TC、FINS、TG、LDL-C 均明显下降,HOMA- β 和 GIR 升高,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);干预组 1 血 FFA 下降,HOMA- β 和 GIR 明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与干预组 1 比较,干预组 2 大鼠的 FBG、FFA、TC 明显下降,HOMA- β 和 GIR 明显升高($P < 0.05$),见表 1。

表 1 4 组大鼠一般项目比较($\bar{x} \pm s$)

项目	对照组($n=6$)	高脂组($n=6$)	干预组 1($n=6$)	干预组 2($n=6$)
FBG(mmol/L)	5.05 \pm 0.20	7.59 \pm 0.70 ^a	6.88 \pm 0.20	5.87 \pm 0.40 ^{ce}
FFA(mmol/L)	0.30 \pm 0.04	0.66 \pm 0.05 ^b	0.61 \pm 0.05 ^{bc}	0.32 \pm 0.03 ^{de}
TC(mmol/L)	1.05 \pm 0.09	1.32 \pm 0.07 ^b	1.37 \pm 0.05 ^b	1.23 \pm 0.06 ^{ce}
TG(mmol/L)	0.16 \pm 0.04	0.33 \pm 0.02 ^b	0.29 \pm 0.02 ^b	0.27 \pm 0.02 ^c
FINS(mmol/L)	19.24 \pm 0.68	30.93 \pm 0.27 ^b	29.26 \pm 0.30 ^b	24.42 \pm 0.31 ^d
LDL-C(mmol/L)	0.26 \pm 0.08	0.43 \pm 0.07 ^b	0.40 \pm 0.07 ^b	0.33 \pm 0.06 ^c
HDL-C(mmol/L)	0.82 \pm 0.07	0.54 \pm 0.06 ^b	0.59 \pm 0.04 ^b	0.60 \pm 0.05 ^a
GIR($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	30.77 \pm 2.37	18.83 \pm 1.95 ^b	21.55 \pm 2.46 ^d	25.80 \pm 1.40 ^{de}
HOMA- β (%)	249.66 \pm 19.87	151.77 \pm 62.07 ^b	173.43 \pm 69.24 ^{bc}	207.3 \pm 14.47 ^{ade}

^a: $P < 0.05$,与对照组比较;^b: $P < 0.01$,与对照组比较;^c: $P < 0.05$,与高脂组比较;^d: $P < 0.01$,与高脂组比较;^e: $P < 0.05$,与干预组 1 比较

2.2 各组大鼠胰腺 ERS 相关因子 mRNA 的表达 与对照组相比,高脂组胰腺 GRP78、ATF4、CHOP 和 TRB3 mRNA 显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与高脂组比较,干预组 1 和干预组 2 的 GRP78、ATF4、CHOP 和 TRB3 mRNA 表达下降,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与干预组 1 比较,干预组 2 GRP78、ATF4、CHOP 和 TRB3 的 mRNA 表达下降,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 1。



*: $P < 0.05$, 与对照组比较; #: $P < 0.05$, 与高脂组比较; △: $P < 0.05$, 与干预组 1 比较

图 1 各组大鼠胰腺 ERS 相关因子 mRNA 的表达

2.3 各组大鼠胰腺 ERS 相关蛋白表达情况 Western blot 检测 4 组大鼠胰腺组织中 GRP78、ATF4、CHOP 和 TRB3 蛋白相对表达水平的比较:与对照组比较,高脂组 GRP78、ATF4、CHOP 和 TRB3 的蛋白表达水平明显高于对照组($P < 0.05$),经利拉鲁肽干预后,干预组 1 和干预组 2 GRP78、ATF4、CHOP 和 TRB3 蛋白表达均下调,明显低于高脂组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与干预组 1 比较,干预组 2 各蛋白表达减少($P < 0.05$),见图 2。

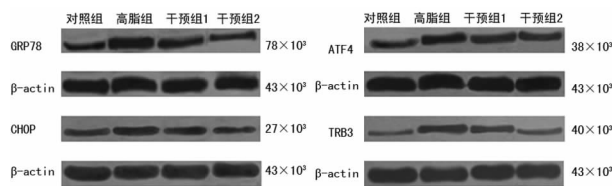


图 2 各组大鼠胰腺 ERS 相关蛋白表达情况

3 讨论

研究发现高脂饮食可导致机体代谢改变及 IR 和胰岛 β 细胞功能紊乱,同时高脂环境是机体诱发 IR 的独立危险因素之一[4-6]。HOMA-β 是用于评价个体的胰岛 β 细胞功能的指标,胰岛 β 细胞功能降低则其数值降低,功能增强则其数值升高。钳夹实验中 GIR 是国际上评价 IR 的金标准,数值越低提示 IR 越明显。本实验结果显示,高脂喂养大鼠与对照组相比,GIR、HOMA-β 下降,FINS 升高,出现了高胰岛素血症、IR 及胰岛 β 功能减退。同时出现 FFA、TC、TG、LDL-C 均显著升高,HDL-C 显著性降低的血脂紊乱。利拉鲁肽是一种长效 GLP-1 类似物,利拉鲁肽干预高脂喂养大鼠 2 周后,GIR 升高,FINS 下降,HOMA-β 升高,血糖、血脂降低,HDL-C 升高,且与 100 μg · kg⁻¹ · d⁻¹ 的利拉鲁肽组比较,200 μg · kg⁻¹ · d⁻¹ 利拉鲁肽干预效果更明显,这表明利拉鲁肽呈浓度依赖性降低高脂饮食大鼠血糖、血脂,有效改善 IR 和胰岛 β 功能减退,与既往的

结果相似[7]。

研究发现高糖、高脂等应激情况下,内质网平衡被打破,使内质网内蛋白质折叠错误并堆积在内质网腔内,持续应激引发 ERS 及细胞凋亡[8]。分子伴侣葡萄糖调节蛋白(GRP78)是 ERS 标志性蛋白。已有相关研究证实高脂条件下,大鼠胰腺发生 IR,内质网应激相关因子 GRP78 表达升高,激活内质网应激相关通路,引起胰岛功能衰退,导致糖尿病,本研究结果与之相似,高脂大鼠胰腺 GRP78 表达升高,这说明 IR 和胰岛功能减退与 ERS 密切相关[9]。双链 RNA 依赖的蛋白激酶样内质网激酶(PERK)是内质网膜上的一种 I 型跨膜蛋白,是 ERS 的 3 条通路之一,持续的 ERS 可使 PERK 激活下游真核起始因子 2α(eIF2α)和转录活化因子-4(ATF4)、前凋亡因子 CCAAT 增强结合蛋白同源蛋白(CHOP)和调解凋亡基因假性激酶 Tribbles 3 (TRB3),CHOP 和 TRB3 均参与细胞凋亡[10-12]。国外学者认为,脂毒性较糖毒性更易诱发 ERS,参与细胞凋亡,导致 IR 和胰岛功能衰退,出现糖尿病[8-9]。已有研究发现,在 INS-1 细胞,棕榈酸诱导 GRP78、ATF4、CHOP 表达升高,提示 FFA 引发的 ERS 反应可能在脂毒性所导致的 β 细胞凋亡的过程中发挥重要作用[13]。本实验结果发现,在高脂情况下,血中 FFA 升高,脂代谢紊乱,大鼠胰腺 GRP78、ATF4、CHOP 和 TRB3 的蛋白和 mRNA 均明显升高,说明高脂引起凋亡相关蛋白和基因的表达异常诱发 ERS,可能参与 IR 和胰岛细胞功能下降有关,与上述研究结果相一致。

Moffett 等[14]发现利拉鲁肽可减少糖尿病大鼠胰腺 β 细胞的凋亡,保护胰岛 β 细胞,但是相关机制尚未阐明。本实验发现利拉鲁肽干预后,GRP78、ATF4、CHOP 的蛋白和 mRNA 及表达明显下降,提示 GLP-1 受体激动剂利拉鲁肽可能通过 ATF4/CHOP 通路缓解 ERS 来保护胰岛 β 细胞功能。已有研究发现 TRB3 不仅参与动脉硬化病理变化,而且与 IR、糖尿病密切相关[15]。本研究发现应用利拉鲁肽后不仅改善 IR,而且下调了 TRB3 的表达,但二者之间的具体机制尚不清楚,需进一步研究。近期临床试验也证实,利拉鲁肽一方面调节紊乱的血脂、血糖,改善 IR 等心血管危险因素,另一方面也改善患者的胰岛 β 细胞功能[16-18]。

综上所述,高脂饮食出现脂代谢紊乱和胰岛素抵抗和胰岛细胞功能受损,应用利拉鲁肽后改善 IR,调节糖脂代谢,缓解胰腺 ERS,抑制 ATF4-CHOP-TRB3 通路基因的表达,减少胰岛细胞凋亡起到保护胰岛细胞功能作用,但是利拉鲁肽在其他组织中是否通过相同机制改善 IR 减轻内质网应激,有待进一步研究。

参考文献

[1] Flamment M, Hajduch E, Ferre P, et al. New insights into ER stress-induced insulin resistance[J]. *Trend Endocrinol Metab*, 2012, 23(8): 381-390.
 [2] Tamura K, Minami K, Kudo M, et al. Liraglutide improves pancreatic Beta cell mass and function in alloxan-induced diabetic mice[J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0126003.
 [3] 高宇, 王英南, 王丽红, 等. 增龄对高脂喂养大鼠胰岛素抵抗和骨骼肌内脂肪的影响[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2013, 15(6): 625-627.
 [4] Stelmach M, Walkowiak J. Dietary interventions and

- changes in cardio-metabolic parameters in metabolically healthy obese subjects: a systematic review with Meta-Analysis[J]. *Nutrients*, 2016, 8(8):455.
- [5] Wu Y, Wu T, Wu J, et al. Chronic inflammation exacerbates glucose metabolism disorders in C57BL/6J mice fed with high-fat diet[J]. *J Endocrinol*, 2013, 219(3):195-204.
- [6] Beejmohun V, Mignon C, Mazollier A, et al. Cashew apple extract inhibition of fat storage and insulin resistance in the diet-induced obesity mouse model[J]. *J Nutr Sci*, 2015, 4(1):e38.
- [7] Zheng J, Chen T, Zhu Y, et al. Liraglutide prevents fast weight gain and β -cell dysfunction in male catch-up growth rats[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2015, 240(9):1165-1176.
- [8] Hirata T, Kawai T, Hirose H, et al. Palmitic acid-rich diet suppresses glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) and induces endoplasmic reticulum (ER) stress in pancreatic islets in mice[J]. *Endocr Res*, 2016, 41(1):8-15.
- [9] Cerf E. High fat programming of beta cell compensation, exhaustion, death and dysfunction[J]. *Pediatr Diabetes*, 2015, 16(2):71-78.
- [10] Brewer W. Regulatory crosstalk within the mammalian unfolded protein response[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2014, 71(6):1067-1079.
- [11] Kim J, Lee J, Kang S, et al. Ionizing radiation activates PERK/eIF2 α /ATF4 signaling via ER stress-independent pathway in human vascular endothelial cells[J]. *Int J Radiat Biol*, 2014, 90(4):306-312.
- [12] Qin J, Fang N, Lou J, et al. TRB3 is involved in free fatty acid-induced INS-1-derived cell apoptosis via the protein kinase C δ pathway[J]. *PLoS One*, 2014, 9(5):e96089.
- [13] Zhu Q, Zhong J, Jin F, et al. Tauroursodeoxycholate, a chemical chaperone, prevents palmitate-induced apoptosis in pancreatic β -cells by reducing ER stress[J]. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2013, 121(1):43-47.
- [14] Moffett C, Patterson S, Irwin N, et al. Positive effects of GLP-1 receptor activation with liraglutide on pancreatic islet morphology and metabolic control in C57BL/KsJ db/db mice with degenerative diabetes [J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2015, 31(3):248-255.
- [15] Prudente S, Trischitta V. The TRIB3 Q84R polymorphism, insulin resistance and related metabolic alterations [J]. *Biochem Soc Trans*, 2015, 43(5):1108-1111.
- [16] Marso P, Daniels H, Brown-Frandsen K, et al. Liraglutide and cardiovascular outcomes in type 2 diabetes[J]. *N Engl J Med*, 2016, 375(4):311-322.
- [17] Zhang L, Zhang M, Zhang Y, et al. Efficacy and safety of dulaglutide in patients with type 2 diabetes: a meta-analysis and systematic review[J]. *Sci Rep*, 2016(6):18904.
- [18] Díaz-Soto G, De Luis DA, Conde-Vicente R, et al. Beneficial effects of liraglutide on adipocytokines, insulin sensitivity parameters and cardiovascular risk biomarkers in patients with type 2 diabetes: a prospective study[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2014, 104(1):92-96.

(收稿日期:2016-11-19 修回日期:2017-04-07)

(上接第 3754 页)

- Current state of anti-PD-L1 and anti-PD-1 agents in cancer therapy[J]. *Mol Immunol*, 2015, 67(2):4-17.
- [2] 赵飞龙, 麦海星, 李学超, 等. PD-1/PD-L1 信号通路在免疫细胞中的作用及其阻断抗体在肿瘤治疗中的应用[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2015(5):701-703.
- [3] Gibson A, Ogees M, Sullivan A, et al. Negative regulation by PD-L1 during drug-specific priming of IL-22-secreting T cells and the influence of PD-1 on effector T cell function[J]. *J Immunol*, 2014, 192(6):2611-2621.
- [4] Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer[J]. *N Engl J Med*, 2012, 366(26):2455-2465.
- [5] Bouchard MJ, Schneider RJ. The enigmatic X gene of hepatitis B virus[J]. *J Virol*, 2004, 78(23):12725-12734.
- [6] Tang H, Oishi N, Kaneko S, et al. Molecular functions and biological roles of hepatitis B virus x protein[J]. *Cancer Sci*, 2006, 97(10):977-983.
- [7] Guo L, Wang X, Ren L, et al. HBx affects CUL4-DDB1 function in both positive and negative manners[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 450(4):1492-1497.
- [8] Feitelson MA, Duan LX. Hepatitis B virus X antigen in the pathogenesis of chronic infections and the development of hepatocellular carcinoma[J]. *Am J Pathol*, 1997(150):1141-1157.
- [9] Li T, Robert EI, van Breugel PC, et al. A promiscuous alpha-helical motif anchors viral hijackers and substrate receptors to the CUL4-DDB1 ubiquitin ligase machinery [J]. *Nat Struct Mol Biol* 2010, 17(2):105-111.
- [10] Angers S, Li T, Yi X, et al. Molecular architecture and assembly of the DDB1-CUL4A ubiquitin ligase machinery [J]. *Nature*, 2006, 443(7111):590-593.
- [11] Carreno BM, Collins M. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition immune responses[J]. *Annu Rev Immunol*, 2002, 20(1):29-53.
- [12] Belloni L, Allweiss L, Guerrieri F, et al. IFN-alpha inhibits HBV transcription and replication in cell culture and in humanized mice by targeting the epigenetic regulation of the nuclear cccDNA minichromosome[J]. *J Clin Invest*, 2012(122):529-537.

(收稿日期:2016-11-28 修回日期:2017-05-06)