

· 基础研究 ·

过表达羧肽酶E对高糖培养的小鼠肾小球系膜细胞增殖和凋亡的影响

张恒璐¹, 陈天宇¹, 王苏雨¹, 李婉^{2*}, 陆卫平^{1*}¹南京医科大学附属淮安第一医院内分泌科, 江苏 淮安 223300; ²南京医科大学病原微生物学系, 江苏 南京 211166

[摘要] 目的:探究羧肽酶E(carboxypeptidase E, CPE)对高糖培养的小鼠肾小球系膜细胞(glomerular mesangial cell, GMC)增殖、周期及凋亡的影响。方法:PCR法扩增CPE基因片段,将其插入表达载体pcDNA3.1质粒中以构建重组质粒pcDNA3.1-CPE。将质粒转染GMC细胞,通过蛋白质免疫印迹法检测CPE标签蛋白、增殖标志物细胞周期蛋白D1(CyclinD1)、增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)以及凋亡标记物Cleaved-caspase-3的表达;采用平板克隆、Cell Counting Kit-8(CCK-8)法以及流式分析法检测过表达CPE对高糖培养的GMC细胞增殖、细胞周期以及凋亡的影响。结果:成功构建CPE过表达的GMC细胞。平板克隆以及CCK-8实验表明,过表达CPE可以抑制GMC细胞的增殖能力。流式细胞学检测表明,与对照组相比,CPE过表达明显促进了细胞凋亡;细胞周期中G1期细胞明显增加,S期细胞明显减少,差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论:过表达CPE可以抑制高糖培养的小鼠GMC细胞增殖并诱导细胞凋亡。

[关键词] 羧肽酶E;小鼠肾小球系膜细胞;糖尿病肾病;增殖;凋亡

[中图分类号] R692.3

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2020)03-374-07

doi: 10.7655/NYDXBNS20200313

Effects of overexpressed carboxypeptidase E on the proliferation and apoptosis of mice glomerular mesangial cells cultured in high glucose

ZHANG Henglu¹, CHEN Tianyu¹, WANG Suyu¹, LI Wan^{2*}, LU Weiping^{1*}¹Department of Endocrinology and Metabolism, the Affiliated Huai'an No.1 People's Hospital of Nanjing Medical University, Huai'an 223300; ²Department of Microbiology, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to investigate the effects of carboxypeptidase E(CPE) on the cell proliferation, cell cycle and apoptosis of mice glomerular mesangial cells(GMC) cultured in high glucose. **Methods:** The CPE gene fragment was amplified by PCR and inserted into the expression vector pcDNA3.1 plasmid to construct the recombinant plasmid pcDNA3.1-CPE. The plasmid was transfected into GMC, and the expression of CPE-tagged protein, proliferation marker CyclinD1, proliferating cell nuclear antigen(PCNA) and apoptosis marker Cleaved-caspase-3 were detected by Western blot; plate cloning, cell counting kit-8(CCK-8) and flow cytometry were used to detect the effect of overexpressed CPE on the proliferation, cell cycle and apoptosis of GMC cells cultured in high glucose. **Results:** The overexpression of CPE in GMC cells was successfully constructed. Plate cloning and CCK-8 showed that overexpression of CPE could inhibit the proliferation of GMC. Flow cytometry showed that the overexpression of CPE significantly promoted the cell apoptosis compared with the control group; the number of cells in G1 phase was significantly increased, while that in S phase was significantly decreased($P < 0.01$). **Conclusion:** CPE can inhibit the proliferation of mice GMC cultured in high glucose and induce cell apoptosis.

[Key words] carboxypeptidase E; mice glomerular mesangial cells; diabetic nephropathy; proliferation; apoptosis

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(03): 374-379, 384]

[基金项目] 江苏省卫生健康委员会课题(H201458);淮安市533英才工程科研项目资助计划(HAA201744)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: wanli@njmu.edu.cn; hyhalwp@sina.com

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病重要的微血管并发症之一,在糖尿病患者中的患病率为20%~40%^[1],已成为终末期肾病的首要病因^[2]。尽早诊断和治疗有助于延缓DN进程,并对终末期肾病的预防具有重大意义。DN的发生发展与多种因素密切相关,基本病理改变为细胞外基质(extracellular matrix, ECM)聚集,基膜增厚,晚期出现弥漫性肾小球硬化,最终导致肾衰竭^[3]。肾小球系膜由肾小球系膜细胞(glomerular mesangial cell, GMC)和由GMC分泌的ECM蛋白组成,并对着肾小球毛细血管有支持作用。其过度增生及由此引起的ECM沉积在肾小球硬化的发生发展中起重要作用,但其具体机制目前仍不清楚^[4],并且现有治疗效果有限,因此研究高糖培养的GMC增生的分子机制,对探索DN的发展机制和寻找潜在的治疗靶点具有重要意义。

羧肽酶(carboxypeptidases, CP)是一种专一性地从肽链C端逐个降解、释放游离氨基酸的肽链外切酶。越来越多的研究表明,羧肽酶在疾病发生发展中发挥着重要作用^[5]。不同种类的羧肽酶已被证明参与了细胞增殖、细胞分化、细胞周期、细胞凋亡等^[6-7]。羧肽酶E(carboxypeptidase E, CPE)也称为羧肽酶H(carboxypeptidase H),已被证明为一种多功能蛋白,在调节内分泌和神经系统平衡等方面起着重要作用^[8]。近来有研究表明,CPE通过调节氧连氮-乙酰葡萄糖胺转移酶(O-GlcNAc transferase, OGT)延缓胰腺β细胞衰竭,在糖尿病中发挥重要作用^[9],然而其在DN中的作用还鲜有报道。本课题组前期应用基因微阵列技术对DN小鼠模型进行了检测^[10],发现DN小鼠CPE的表达量与正常小鼠相比显著降低,因此推测CPE与DN的发生发展存在一定关系。小鼠GMC的生理特性决定了其为重要的靶细胞和效应细胞^[11],因此高糖培养的小鼠GMC在以往实验中被用来探究DN中GMC的变化^[12]。本研究通过构建过表达CPE的小鼠GMC,并检测细胞增殖及凋亡,发现过表达CPE可以抑制小鼠GMC增殖并促进凋亡,研究结果为寻找DN治疗的分子靶标提供了新的依据。

1 材料和方法

1.1 材料

小鼠GMC细胞株SV40-MES14细胞(中国科学院上海细胞库)。DMEM培养基、F12培养基、胎牛血清(Gibco公司,美国);大肠杆菌DH5α(北京擎科

生物科技有限公司);小量质粒提取试剂盒(Omega公司,美国);质粒转染试剂Lipofectamine™2000脂质体(Invitrogen公司,美国);抗CyclinD1抗体、抗PCNA抗体(Abcam公司,美国);抗Caspase-3抗体(Cell Signaling Technology公司,美国);抗CPE抗体(武汉三鹰公司);CCK-8试剂盒(Dojindo公司,日本);Annexin V-PE凋亡检测试剂盒(南京诺维赞公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物实验

8周龄SPF级肥胖性2型糖尿病动物模型C57BL/kSJ-db/db小鼠和同窝对照鼠C57BL/kSJ(南京大学动物模式研究所),小鼠适应性喂养1周,测定血糖、体重、尿量、24 h尿白蛋白后,取小鼠肾组织行PAS染色及HE染色,明确DN的诊断,并收集小鼠肾脏皮质组织,存放于-80℃冰箱保存备用^[13],该方案经南京医科大学实验动物伦理委员会批准,所有程序都符合规定。

组织中加入TRIzol试剂,用研磨棒将组织磨匀成悬液,提取组织RNA;保存的组织样本中加入裂解液,用组织匀浆机匀浆至无明显肉眼可见固体^[14],提取组织蛋白。

1.2.2 细胞培养

小鼠GMC分别培养在葡萄糖浓度为5 mmol/L(低糖组)和25 mmol/L(高糖组)的DMEM/F12(3:1)完全培养基中(含5%胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 μg/mL链霉素),以模拟正常人及糖尿病患者的体内环境。

细胞置于37℃、5%CO₂细胞培养箱中,2~3 d传代1次。取对数生长期细胞进行实验操作。

1.2.3 质粒构建

根据CPE基因的核酸序列设计扩增引物。上游引物:5'-CGGGATCCATGGCCGGGC GCGGAG-GAC-3',下游引物:5'-CCGCTCGAGTTACTTATCGT-CGTCATCCTTGTAATCAAATTCAAAGTTTCTGAC-ATCA-3'。以小鼠GMC基因组cDNA为模板,PCR扩增CPE片段。产物经BamH I和Xho I限制性内切酶消化后插入pcDNA 3.1载体,构建重组质粒pcDNA3.1-CPE。PCR反应条件为:95℃ 3 min;95℃ 30 s,58℃ 1 min,72℃ 1 min,30个循环。

1.2.4 质粒转染

将小鼠GMC以每孔1×10⁵个的密度接种至6孔细胞培养板中,并加入2 mL DMEM培养基,37℃培养箱静置过夜。使用Lipofectamine™2000作为载体,按照说明书的剂量和方法,将过表达质粒CPE

(pcDNA3.1-CPE)及其阴性对照质粒(pcDNA3.1)转染到细胞内,静置培养6 h,之后更换之前所述的完全培养基终止转染。继续培养48 h后收集细胞检测其转染效率,符合实验预期后可用于细胞功能实验。

1.2.5 RT-qPCR检测

加入TRIzol试剂后提取细胞总RNA, RNA用miScript II RT试剂盒逆转录为cDNA。PCR循环条件设置为95℃ 30 s预变性;95℃ 10 s,60℃ 30 s,共40个循环;95℃ 15 s,60℃ 60 s,95℃ 15 s采集熔解曲线。所使用的特定引物如下:CPE上游引物5'-CCTTCGAGTACCACCGCTATC-3',下游引物5'-CAACCGCCTCATTACCATGC-3'; β -actin上游引物5'-GTGACGTTGACATCCGTAAGA-3',下游引物5'-GCCGGACTCATCGTACTCC-3'。

1.2.6 蛋白质免疫印迹实验

在培养板中加入含有蛋白酶抑制剂的细胞裂解液,用细胞刮刮下细胞。于振荡器上震荡15 s,后冰浴8 min,重复此步骤3次。然后沸水浴5 min,再次冰浴5 min。将准备好的蛋白样品用SDS-PAGE电泳分离后湿转法转至PVDF膜。随后用5%脱脂奶粉溶液在室温下封闭2 h,用目标蛋白抗体4℃孵育过夜。TBST洗脱后孵HRP标记的二抗,再次洗脱,随后采用ECL化学发光检测蛋白条带。所有抗体均参照说明书稀释使用。

1.2.7 细胞增殖实验

CCK-8实验:将细胞 2×10^3 个(200 μ L)接种于96孔板中,每组设6个复孔,共铺5块板。每天同一时间向每个孔中加入10 μ L CCK-8试剂并在37℃下孵育1 h。酶标仪测量450 nm处吸光度值。平板克隆实验:将100个细胞接种到6孔板中,当单个细胞系在体外增殖6代以上,其后代所组成的细胞群体成为集落或克隆。每个克隆含有50个以上的细胞,大小0.3~1.0 mm^[15]。生长2周后,甲醇固定30 min,再用0.1%结晶紫将细胞群落染色。实验重复3次。

1.2.8 细胞周期实验

将处理后细胞接种于6孔板,密度为 1×10^6 个/孔,培养24 h后收集细胞悬液,用75%乙醇固定,放入流式管中,-20℃保存。将乙醇固定的细胞悬液以1 800 r/min离心5 min。去上清,用PBS洗涤3次。每管加入碘化丙啶(propidium iodide, PI)试剂盒染液0.5 mL,室温避光1 h,进行染色。滤膜过滤,去除细胞团块。每个实验重复3次。上机检测,采集20 000个细胞数据,数据用MODFIT3.0软件分析。

1.2.9 细胞凋亡实验

小鼠GMC以 5×10^5 个/孔接种到6孔板中,根据凋亡检测试剂盒说明书的实验流程,培养24 h后用不含EDTA的胰酶消化300 g,4℃离心5 min收集细胞。用预冷的PBS洗涤细胞2次,每次均在300 g,4℃离心5 min,随后加入100 μ L 1 \times Binding Buffer重悬细胞,加入5 μ L PE和5 μ L 7-AAD染色,轻轻混匀。避光,室温反应10 min。加入400 μ L 1 \times Binding Buffer,轻轻混匀。实验单独重复3次。最后,在FACS Calibur流式细胞仪上检测各个时期细胞凋亡的百分比。

1.3 统计学方法

所有数据分析采用SPSS20.0软件。实验数据以均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,CCK-8实验中两组间比较采用两因素方差分析检验(two-way ANOVA),考虑处理条件及时间两个因素的影响,其余两组间的比较采用Student's *t*检验。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CPE在糖尿病肾病小鼠肾组织中低表达

qPCR检测了正常和DN小鼠肾组织CPE的表达水平,结果显示DN小鼠肾组织中CPE mRNA水平较正常小鼠肾组织明显降低。Western blot检测结果证明DN小鼠肾组织中的CPE蛋白表达下调明显,差异有统计学意义($P < 0.001$,图1)。

2.2 CPE在高糖培养的小鼠GMC中低表达

提取低糖组和高糖组GMC的RNA及蛋白,进行RT-qPCR和Western blot实验,检测CPE在mRNA和蛋白水平的表达。与低糖组相比较,在高糖培养的GMC中,CPE表达量明显降低($P < 0.001$,图2)。

2.3 在高糖培养的小鼠GMC细胞中过表达CPE

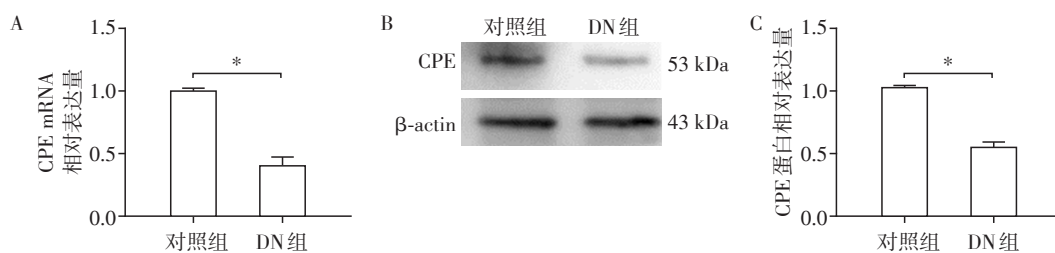
RT-qPCR结果显示,转染重组质粒pcDNA3.1-CPE后,GMC中CPE的表达水平与对照组相比明显上升。Western blot结果与qPCR结果一致,表明成功构建过表达CPE的GMC细胞(图3)。

2.4 过表达CPE抑制小鼠GMC增殖

平板克隆实验结果显示,体外过表达CPE后,GMC集落形成数量明显减少(图4A);CCK-8实验显示,与对照组相比,过表达CPE的GMC增殖能力显著减弱(图4B),提示CPE在维持GMC增殖能力方面发挥了重要作用。

2.5 过表达CPE改变小鼠GMC的细胞周期

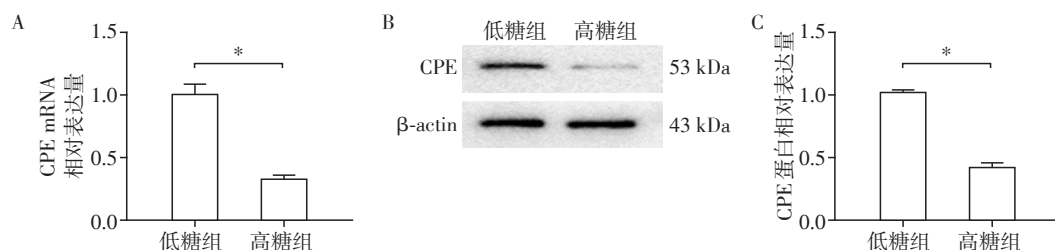
分别对pcDNA3.1组以及pcDNA3.1-CPE组的细胞进行了细胞周期检测。与pcDNA3.1组相比,pcDNA3.1-CPE组S期即DNA复制期比例明显减少,



A: RT-qPCR检测DN小鼠肾组织中CPE mRNA表达水平;B、C:蛋白质免疫印迹实验检测了DN小鼠肾组织中CPE蛋白的表达水平(B: Western blot实验结果;C:蛋白半定量分析结果)。两组比较,* $P < 0.001$ ($n=3$)。

图1 糖尿病肾病小鼠肾组织中的CPE表达水平

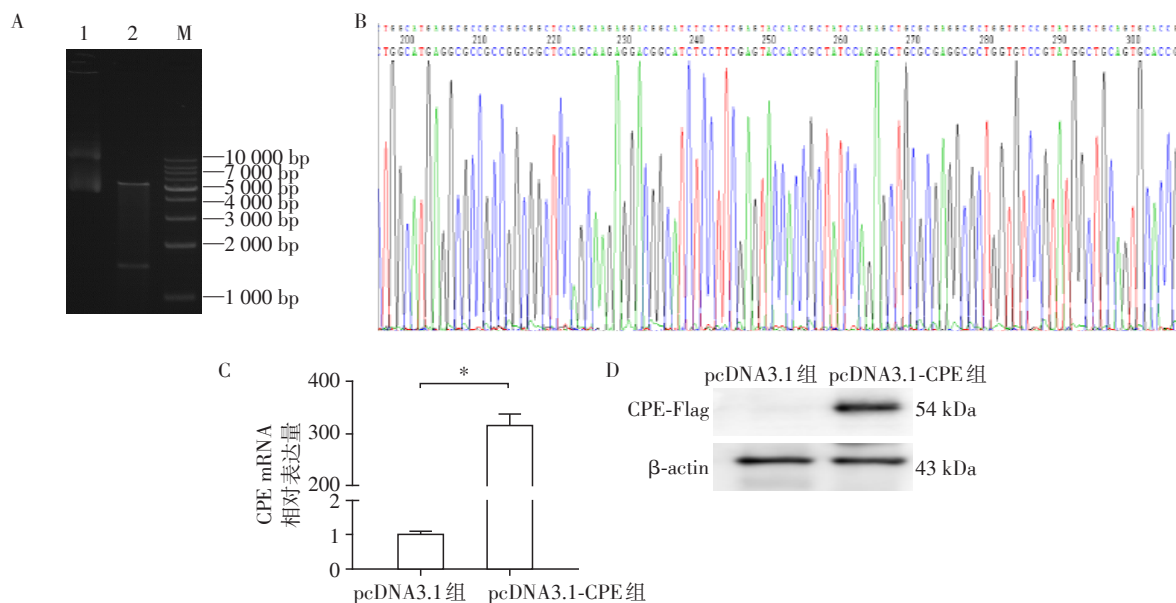
Figure 1 CPE expression in kidney tissues of diabetic nephropathy mice



A: RT-qPCR;B、C:蛋白质免疫印迹实验(B:Western blot实验结果;C:蛋白半定量分析结果)。两组比较,* $P < 0.001$ ($n=3$)。

图2 不同浓度葡萄糖培养的小鼠GMC中CPE的表达水平

Figure 2 CPE expression level in mice GMC cultured at different glucose concentrations



A: pcDNA3.1-CPE的PCR鉴定。M:DNA Maker;1:pcDNA3.1-CPE;2:质粒*Bam*H I/*Xho* I双酶切产物。B:pcDNA3.1-CPE的部分测序分析结果;C:RT-qPCR分析CPE mRNA的相对表达量;D:蛋白质免疫印迹实验。两组比较,* $P < 0.001$ ($n=3$)。

图3 重组质粒pcDNA3.1-CPE的鉴定及转染后CPE在小鼠GMC中的表达水平

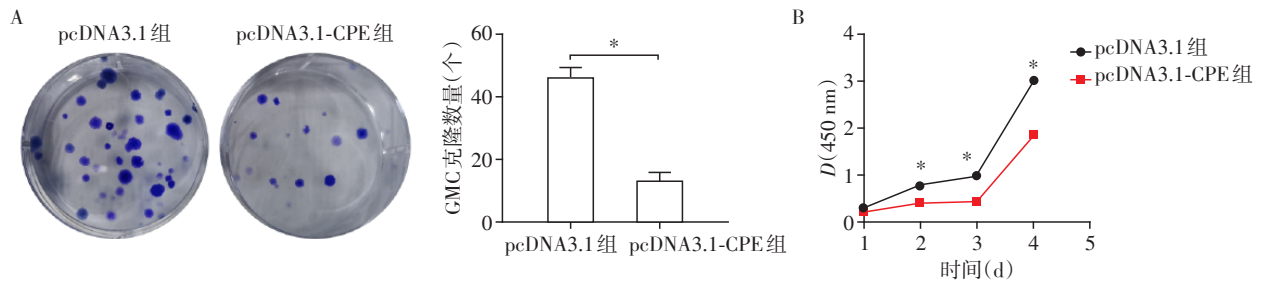
Figure 3 Identification of recombinant plasmid pcDNA3.1-CPE and expression level of CPE in mice GMC after transfection

G0/G1期即有丝分裂完成到DNA复制之前的间隙比例增加,G2/M期无明显变化(图5),提示过表达CPE后明显延缓细胞周期进程。

2.6 过表达CPE促进小鼠GMC凋亡

流式细胞仪检测结果显示,pcDNA3.1-CPE组

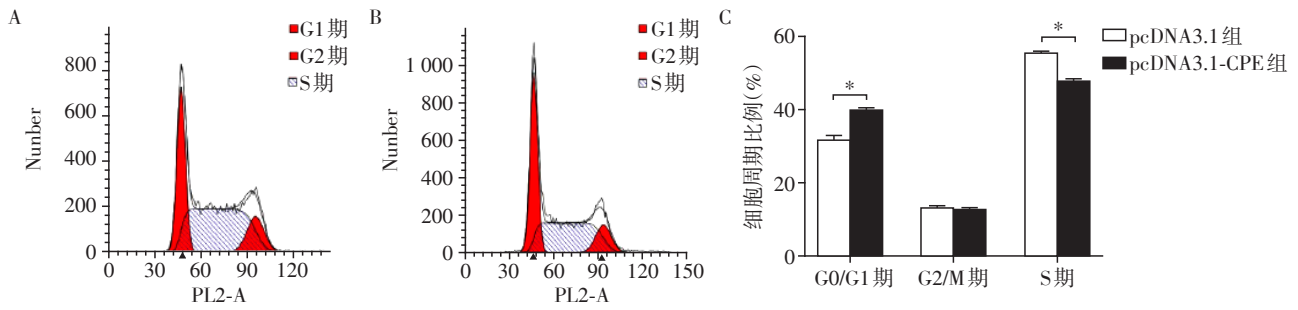
的细胞凋亡数明显高于对照pcDNA3.1组(图6A、B)。同时,采用Western blot检测细胞增殖标志物CyclinD1、PCNA以及细胞凋亡标志物Cleaved-caspase-3的蛋白表达水平。结果显示,过表达CPE后CyclinD1、PCNA的蛋白表达水平与对照组相比明显



A: 平板克隆实验结果; B: CCK-8 实验结果。两组比较, * $P < 0.001 (n=3)$ 。

图4 过表达CPE后减弱小鼠GMC的增殖能力

Figure 4 Over-expression of CPE attenuates the proliferation of mice GMC



A: pcDNA3.1组流式分析结果; B: pcDNA3.1-CPE组流式分析结果; C: 两组细胞周期比较。两组比较, * $P < 0.001 (n=3)$ 。

图5 CPE对小鼠GMC细胞周期的影响

Figure 5 Effect of CPE on cell cycle of mice GMC

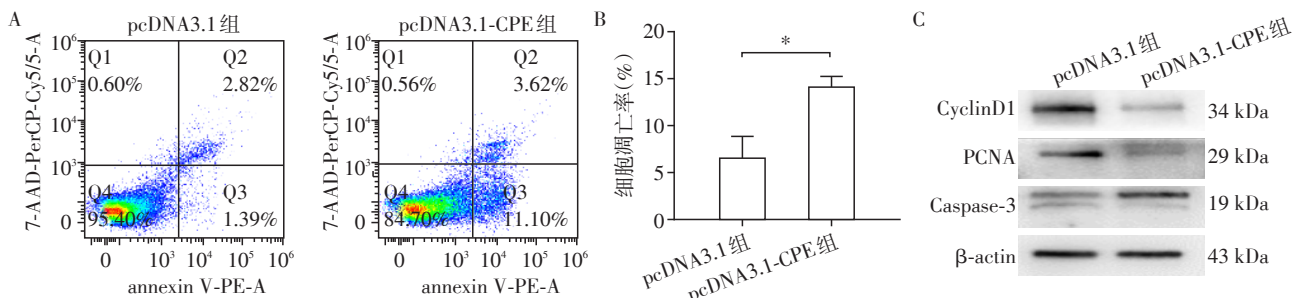
下降, Cleaved-caspase-3 的表达水平显著上升(图6C), 提示CPE可能通过相关蛋白发挥抑制细胞增殖、促进细胞凋亡的作用。

3 讨论

近年来, 2型糖尿病已成为全球公共卫生问题。根据国际糖尿病联合会报道, 全世界糖尿病人口预计从2015年的4.15亿增加到2040年的6.42亿^[16]。作为糖尿病重要的慢性并发症之一, DN患者人数在世界范围内持续上升, 然而, 目前临床上治疗方法主要有降糖、降压、调脂、改善肾功能, 不能有效延缓DN的进展, 因此DN的预防和治疗仍需要进一

步探索。

CPE为M14家族金属羧肽酶的成员, 是多种激素肽和神经递质生物合成过程中最主要的羧肽酶。CPE有可溶性CPE和膜结合型CPE两种存在形式: 前者为肽链C端端解酶, 可激活神经肽; 后者为分选受体, 对分泌颗粒内的分泌蛋白进行定向输送^[17]。研究表明, CPE为一种新的神经保护营养因子^[18], 并且参与了肿瘤的进展, 对肿瘤细胞分化、迁移、增殖的影响不完全相同^[19-21]。CPE基因突变或敲除小鼠, 因激素原的处理功能减弱, 肽类激素和神经肽的合成减少, 出现高胰岛素血症、血糖升高、肥胖和骨质疏松等病理现象^[22]。



A: 流式分析法检测过表达CPE后对小鼠GMC凋亡的影响, Q3、Q2分别代表早期、晚期凋亡; B: 两组细胞凋亡率比较, 两组比较, * $P < 0.01 (n=3)$; C: 蛋白质免疫印迹实验检测细胞增殖标志物 CyclinD1、PCNA 以及细胞凋亡标志物 Cleaved-caspase-3 的蛋白表达水平。

图6 过表达CPE后能显著促进小鼠GMC凋亡

Figure 6 Over-expression of CPE significantly promoted the apoptosis of mice GMC

Burch 等^[23]将糖尿病供体的全胰腺组织裂解物进行蛋白质组学分析,与非糖尿病供体相比,CPE表达量明显降低。

本课题组的前期测序结果表明, DN 小鼠组织中的 CPE 水平较正常组织明显降低。因此推测其与 DN 的发生发展有一定关系。蛋白免疫印迹和 RT-qPCR 实验发现 DN 小鼠肾脏组织中 CPE 蛋白与 mRNA 水平相对低表达。在高糖和低糖培养的小鼠 GMC 中, CPE 表达趋势与 DN 小鼠肾组织检测结果一致。由此提示, CPE 在 DN 中的作用可能与 GMC 病理改变相关。为进一步研究 CPE 的功能,本研究构建了 CPE 的重组质粒,分别观察 CPE 对高糖培养的小鼠 GMC 细胞增殖、周期以及凋亡的影响。CCK-8 以及平板克隆形成实验显示,转染 pcDNA-3.1-CPE 的小鼠 GMC 生长速度相对对照组显著减慢,且细胞增殖标志物 CyclinD1 及 PCNA 的蛋白表达水平下降,表明过表达 CPE 可以抑制小鼠 GMC 增殖。维持细胞增殖和凋亡之间的动态平衡是组织发挥正常生理功能的关键,本研究采用流式细胞术检测过表达 CPE 对小鼠 GMC 周期及凋亡的影响,结果显示 G0/G1 期比例升高, S 期比例下降,产生细胞周期阻滞,细胞凋亡率显著增加,并且 Western blot 结果表明,过表达 CPE 后细胞中活化的 Cleaved-caspase-3 表达量高于对照组。

本研究有一定局限性,本研究以体外实验为主,不能完全反映在 DN 时 CPE 发挥的真实生物学功能。另外, CPE 作为羧肽酶,已被证实能特异结合胰岛素酶原,催化其转化为胰岛素而发挥作用,因此, CPE 在糖尿病和 DN 中的具体作用机制有待进一步探究^[24-25]。

[参考文献]

- [1] GHEITH O, FAROUK N, NAMPOORY N, et al. Diabetic kidney disease: world wide difference of prevalence and risk factors[J]. *J Nephroarmacol*, 2016, 5(1):49-56
- [2] JHA V, GARCIA-GARCIA G, ISEKI K, et al. Chronic kidney disease: global dimension and perspectives[J]. *Lancet*, 2013, 382(9888):260-272
- [3] XIONG Y, ZHOU L. The signaling of cellular senescence in diabetic nephropathy[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 10:7495629
- [4] UMANATH K, LEWIS J B. Update on diabetic nephropathy: core curriculum 2018[J]. *Am J Kidney Dis*, 2018, 71(6):884-895
- [5] KAWATANI M, YAMAMOTO K, YAMADA D, et al. Fluorescence detection of prostate cancer by an activatable fluorescence probe for PSMA carboxypeptidase activity[J]. *J Am Chem Soc*, 2019, 141(26):10409-10416
- [6] ZHANG H, HAO C, WANG H, et al. Carboxypeptidase a4 promotes proliferation and stem cell characteristics of hepatocellular carcinoma[J]. *Int J Exp Pathol*, 2019, 100(2):133-138
- [7] PAN H, PAN J, JI L, et al. Carboxypeptidase α 4 promotes cell growth via activating STAT3 and ERK signaling pathways and predicts a poor prognosis in colorectal cancer[J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 138(7):125-134
- [8] CAWLEY N X, WETSEL W C, MURTHY S R, et al. New roles of carboxypeptidase E in endocrine and neural function and cancer[J]. *Endocr Rev*, 2012, 33(2):216-253
- [9] JO S, LOCKRIDGE A, ALEJANDRO E U. eIF4G1 and carboxypeptidase E axis dysregulation in O-GlcNAc transferase-deficient pancreatic β -cells contributes to hyperinsulinemia in mice[J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(35):13040-13050
- [10] WANG M, YAO D, WANG S, et al. Long non-coding RNA ENSMUST00000147869 protects mesangial cells from proliferation and fibrosis induced by diabetic nephropathy[J]. *Endocrine*, 2016, 54(1):81-92
- [11] KAUR H, CHIEN A, JIALAL I. Hyperglycemia induces Toll like receptor 4 expression and activity in mouse mesangial cells: relevance to diabetic nephropathy[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2012, 303(8):F1145-F1150
- [12] MASON R M, WAHAB N A. Extracellular matrix metabolism in diabetic nephropathy[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2003, 14(5):1358-1373
- [13] WANG S, CHEN X, WANG M, et al. Long non-coding RNA CYP4B1-PS1-001 inhibits proliferation and fibrosis in diabetic nephropathy by interacting with nucleolin[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 49(6):2174-2187
- [14] ZHANG J, ZHANG H, WANG Z, et al. BTLA suppress acute rejection via regulating TCR downstream signals and cytokines production in kidney transplantation and prolonged allografts survival[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1):12154
- [15] CONCONI M T, BAIGUERA S, GUIDOLIN D, et al. Effects of hyperbaric oxygen on proliferative and apoptotic activities and reactive oxygen species generation in mouse fibroblast 3T3/J2 cell line[J]. *J Investig Med*, 2003, 51(4):227-232
- [16] GREGG E W. The changing tides of the type 2 diabetes epidemic-smooth sailing or troubled waters ahead? kelly West award lecture 2016[J]. *Diabetes Care*, 2017, 40(10):1289-1297
- [17] JI L, WU H T, QIN X Y, et al. Dissecting carboxypeptidase E: properties, functions and pathophysiological roles

(下转第384页)

- interstitial cells of cajal networks and nNOS mRNA expression in antrum of STZ-induced diabetic rats[J]. *PLoS One*, 2016, 11(12):e0166638
- [3] 余远红,殷璐,丁叶,等. 大鼠孕期和哺乳期高蛋白饮食对子代代谢相关激素的影响[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2017, 37(7):809-813
- [4] GOYAL R K, GUO Y, MASHIMO H. Advances in the physiology of gastric emptying[J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2019, 31(4):e13546
- [5] CELLEK S, FOXWELL N, MONCADA S. Two phases of nitrenergic neuropathy in streptozotocin - induced diabetic rats[J]. *Diabetes*, 2003, 52(9):2353-2362
- [6] 马静,芮海波,陈全战,等. 灵芝多糖对链脲佐菌素诱导的糖尿病肾病小鼠抗炎活性及疗效研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2019, 39(3):326-331
- [7] ZHANG Z, YIN J, CHEN J D. Ameliorating effects of auricular electroacupuncture on rectal distention - induced gastric dysrhythmias in rats[J]. *PLoS One*, 2015, 10(2):e0114226
- [8] 朱伟坚,徐妍,周静珠,等. 电针耳迷走神经点防治恶性肿瘤患者化疗后恶心、呕吐的临床观察[J]. *中国中医急症*, 2015, 24(2):291-293
- [9] 朱伟坚,刘晓铭,仲远明,等. 食管癌耳穴特异性的临床观察[J]. *针灸临床杂志*, 2012, 28(2):4-7
- [10] BRELAND A, HA S, JORGENSEN B G, et al. Smooth muscle transcriptome browser: offering genome-wide references and expression profiles of transcripts expressed in intestinal SMC, ICC, and PDGFR α + cells[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1):387
- [11] POWLEY T L, PHILLIPS R J. Vagal intramuscular array afferents form complexes with interstitial cells of Cajal in gastrointestinal smooth muscle: analogues of muscle spindle organs?[J]. *Neuroscience*, 2011, 186:188-200
- [12] 毛兰芳,汪龙德,张宏伟,等. 功能性消化不良与脑肠肽的研究进展[J]. *世界华人消化杂志*, 2015, 23(4):570-576
- [13] MULLER T D, NOGUEIRAS R. Ghrelin[J]. *Mol Metab*, 2015, 4(6):437-460
- [14] KIM J N, KIM B J. The mechanism of action of ghrelin and motilin in the pacemaker potentials of interstitial cells of cajal from the murine small intestine [J]. *Mol Cells*, 2019, 42(6):470-479
- [15] 林旭红,魏丹丹,王慧超,等. 孤儿G蛋白偶联受体55在糖尿病性胃轻瘫小鼠发病中的作用[J]. *生理学报*, 2014, 66(3):332-340
- [16] JANG J H, LEE D J, BAE C H, et al. Changes in small intestinal motility and related hormones by acupuncture stimulation at zusanli (ST 36) in mice [J]. *Chin J Integr Med*, 2017, 23(3):215-220
- [17] GUO H, ZHU S F, ZHANG R R, et al. Electroacupuncture ameliorates acute lung injury through promoting gastrointestinal motility in rats with acute pancreatitis[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014, 2014:943596
- [收稿日期] 2019-09-03

(上接第379页)

- in disease[J]. *Endocr Connect*, 2017, 6(4):R18-R38
- [18] CHENG Y, GAWLEY N X, LOH Y P, et al. Carboxypeptidase E(NF- α 1): a new trophic factor in neuroprotection [J]. *Neurosci Bull*, 2014, 30(4):692-696
- [19] FAN S, LI X, LI L, et al. Silencing of carboxypeptidase E inhibits cell proliferation, tumorigenicity, and metastasis of osteosarcoma cells[J]. *Onco Targets Ther*, 2016, 9(6):2795-2803
- [20] SUN J, MENG D, LI L, et al. N-terminal truncated carboxypeptidase E expression is associated with poor prognosis of lung adenocarcinoma [J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(6):4659-4664
- [21] KIM H J, HONG J, YOON H J, et al. Carboxypeptidase E is a novel modulator of RANKL-induced osteoclast differentiation[J]. *Mol Cells*, 2014, 37(9):685-690
- [22] CAWLEY N X, YANIK T, WORONOWICZ A, et al. Obese carboxypeptidase E knockout mice exhibit multiple defects in peptide hormone processing contributing to low bone mineral density [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2010, 299(2):E189-E197
- [23] BURCH T C, MORRIS M A, CAMPBELL-THOMPSON M, et al. Proteomic analysis of disease stratified human pancreas tissue indicates unique signature of type 1 diabetes[J]. *PLoS One*, 2015, 10(8):e0135663
- [24] CHEN Y C, TAYLOR A J, VERCHERE C B. Islet prohormone processing in health and disease[J]. *Diabetes Obes Metab*, 2018, 20(Suppl 2):64-76
- [25] 徐一力,沈冲,钱军,等. 经肾活检病理确诊的糖尿病肾病患者贫血相关因素分析[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2018, 38(10):1376-1383
- [收稿日期] 2019-09-21