

· 基础研究 ·

S1PR2在非酒精性脂肪性肝炎中的作用初探

张 培,张园园,严君君,李梦羽,周希乔*

南京医科大学第一附属医院消化内科,江苏 南京 210029

[摘要] 目的:探讨1-磷酸-鞘氨醇受体2(sphingosine-1-phosphate receptor 2, S1PR2)、前蛋白转化酶枯草溶菌素9(proprotein convertase subtilisin/kexin type 9, PCSK9)对非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)肝脏损伤可能的调控机制。方法:将12只C57BL/6J小鼠随机分为对照组和实验组,对照组给予普通饮食,实验组给予蛋氨酸-胆碱缺乏饮食(methionine choline deficiency diet, MCD), MCD 6周建立NASH模型。6周末ELISA检测血清和肝脏生化指标丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、谷氨酰转氨酶(glutamyl transferase, GGT)及炎症因子肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、白细胞介素6(interleukin-6, IL-6)、 γ -干扰素(interferon- γ , IFN- γ)的水平;HE染色、油红O染色和天狼星红染色分别观察肝脏炎症、脂质沉积和纤维化情况。小鼠原代肝细胞和HepG2细胞分别予棕榈酸和/或JTE-013(S1PR2特异性抑制剂)处理,油红O染色观察肝细胞内脂质沉积情况,蛋白免疫印迹实验检测S1PR2、PCSK9和低密度脂蛋白受体(low density lipoprotein cholesterol receptor, LDLR)的蛋白表达。构建S1PR2干扰、过表达质粒,分别转染HepG2细胞,进行转录组测序寻找S1PR2潜在关联基因,并在NASH造模小鼠中检测筛选出的基因的表达情况。结果:喂养6周后实验组小鼠较对照组肝组织S1PR2表达减少、PCSK9表达增加;使用JTE-013可加重小鼠肝原代细胞和HepG2细胞内脂质沉积,使ERK磷酸化增加,PCSK9表达升高、LDLR降低;S1PR2干扰、过表达质粒分别转染的HepG2细胞中,共有343种基因发生改变,其中早期生长反应蛋白1(early growth response protein 1, Egr1)在S1PR2过表达时增加、干扰时降低,并在NASH模型小鼠中表达减少。结论:S1PR2参与NASH的脂质沉积和炎症损伤过程,这可能与炎症状态下S1PR2被抑制后促进PCSK9表达,降低LDLR表达有关。

[关键词] 非酒精性脂肪性肝炎;S1PR2;前蛋白转化酶枯草溶菌素9;脂代谢

[中图分类号] R575.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2020)06-810-07

doi: 10.7655/NYDXBNS20200607

Preliminary study on S1PR2 in nonalcoholic steatohepatitis

ZHANG Pei, ZHANG Yuanyuan, YAN Junjun, LI Mengyu, ZHOU Xiqiao*

Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to investigate the role of sphingosine-1-phosphate receptor 2 (S1PR2), proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) in nonalcoholic steatohepatitis (NASH). **Methods:** Twelve C57BL/6J mice were randomly assigned to control group and experimental group. After NASH models were successfully established by methionine choline deficiency diet (MCD) diet for six weeks, biochemical indices and inflammatory factors in serum and liver, including alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), glutamyl transferase (GGT), tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and interferon- γ (IFN- γ) were detected by ELISA. HE staining, oil red O staining and sirius red staining were used to observe liver inflammatory damage, lipid deposition and fibrosis. *In vitro*, the primary hepatocytes of C57BL/6J mice and HepG2 cells were challenged with palmitic acid and/or JTE-013 (S1PR2 specific inhibitor), respectively; the lipid deposition was observed by oil red O staining, and the protein expression of S1PR2, PCSK9 and low-density lipoprotein cholesterol receptor (LDLR) was detected by Western blot. HepG2 cells were transfected with S1PR2 interference or overexpression plasmids to find potential related genes by gene chip technology, and genes with significant expression differences were screened out in NASH mice. **Results:** Compared with the control group, expression level of liver S1PR2 was decreased and PCSK9 increased in experimental group. In mouse primary hepatocytes and HepG2 cells, JTE-

[基金项目] 国家自然科学基金(81570522);江苏省卫健委强卫工程青年人才(QNRC2016568)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: zhouxqiao@njmu.edu.cn

013 could increase lipid deposition, and increase the expression of phosphorylated ERK and PCSK9, while the expression of LDLR was decreased. A total of 343 genes were changed in HepG2 cells transfected with S1PR2 knockdown and overexpression plasmids. The levels of early growth response protein 1 (Egr1) increased when S1PR2 was overexpressed and decreased when S1PR2 was interfered, and decreased in NASH model mice. **Conclusion:** S1PR2 is involved in the lipid metabolism and inflammatory injury of NASH, which may be related to the suppression of S1PR2 in inflammatory state, increasing the expression of PCSK9 and decreasing the expression of LDLR.

[Key words] nonalcoholic steatohepatitis; S1PR2; PCSK9; lipid metabolism

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(06): 810-815, 845]

非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)是以肝细胞脂质过度贮积和脂肪变性为特征,并排除乙醇和其他明确可引起肝脂肪变原因的临床病理综合征,随着肥胖和代谢综合征的流行,NAFLD患病率逐年攀升,现已成为我国最常见的慢性肝病之一,并取代传染性肝病成为健康查体肝酶异常的首要原因^[1]。NAFLD是一个疾病谱,包括单纯性脂肪变、非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)、肝纤维化、肝硬化甚至肝癌^[2],严重影响患者生活质量^[3]。因此深入研究NASH疾病进展机制是当前热点之一。

我们的前期研究发现胆汁酸可与1-磷酸鞘氨醇受体2(sphingosine-1-phosphate receptor 2, S1PR2)结合激活AKT及ERK1/2信号通路进而调节核转录因子,发挥调节肝细胞糖、脂代谢的效应^[4],在小鼠、大鼠及人的肝细胞中, S1PR2 mRNA均呈高水平表达,而黄连素可竞争性结合S1PR2,激活ERK1/2信号通路,调节肝细胞糖、脂代谢^[5]。且S1PR2基因缺失小鼠在高脂饮食喂养后,肝脏脂肪变性减轻^[6]。既往文献报道, S1PR2是1-磷酸鞘氨醇受体家族成员之一,与G蛋白耦联后可激活ERK1/2信号通路,继而调节STAT3和NF- κ B等转录因子的表达,影响细胞的生存、凋亡、增殖、分化、迁移等生物过程,在肺癌、乳腺癌、神经胶质瘤、黑色素瘤等多种肿瘤疾病中发挥着重要作用^[7]。关于S1PR2在NASH发生发展中的作用机制尚无深入研究。

NASH发病机制复杂,脂代谢紊乱、基因突变和肠道微生物失调等多种因素参与其中^[8-9]。研究表明, NASH患者胆固醇合成限速酶表达升高,致胆固醇合成增加及低密度脂蛋白受体(low density lipoprotein cholesterol receptor, LDLR)蛋白水平下降^[10]。而LDLR的表达水平受前蛋白转化酶枯草溶菌素9(proprotein convertase subtilisin/kexin type 9, PCSK9)调节, PCSK9基因敲除可导致小鼠糖耐量降低^[11-12]。

值得注意的是,黄连素也可影响PCSK9表达^[13],且PCSK9同时受ERK信号通路的抑制,而ERK磷酸化是S1PR2激活后主要的下游信号反应,故本研究旨在揭示S1PR2通过调节PCSK9对NASH脂质沉积的影响,为未来探寻NASH发生机制、寻找治疗靶标提供新的角度。

1 材料和方法

1.1 材料

研究所使用的雄性C57BL/6J小鼠20只,购买并饲养于南京医科大学医药实验动物中心。人肝癌细胞株HepG2购自中科院上海生命科学研究院细胞资源中心。蛋氨酸-胆碱缺乏饮食(methionine choline deficiency diet, MCD)饲料、普通饲料(Research Diets公司,美国); S1PR2特异性抑制剂JTE-013(Cayman公司,美国);油红染料(北京索莱宝科技有限公司); Percoll分离液、棕榈酸(palmitic acid, PA, Sigma公司,美国); 0.25% Trypsin-EDTA细胞消化液、DMEM细胞培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, 维森特生物技术南京有限公司);一步法凝胶制备试剂盒(杭州弗德生物技术有限公司); ELISA试剂盒(南京弼马温生物医药技术有限公司);蛋白裂解液、蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂(上海碧云天生物技术有限公司);早期生长反应蛋白1(early growth response protein 1, Egr1)、ERK、p-ERK、GAPDH抗体(Cell Signaling Technology公司,美国); PCSK9、LDLR抗体(Thermo公司,美国); β -actin抗体、HRP标记山羊抗小鼠和抗兔二抗(上海碧云天生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组和模型建立

实验小鼠饲养于SPF级动物房,自由进食、饮水,动物房具备独立通风笼具(IVC)系统,室温24℃,相对湿度55%~65%,采用12 h/12 h昼夜交替

光照。12只C57BL/6J小鼠经普通饲料适应性喂养1周后,随机分为对照组、实验组,每组6只。对照组予以普通饲料,实验组予以MCD饲料,持续6周。研究方案符合南京医科大学动物伦理委员会要求。

1.2.2 动物组织取材

第6周末小鼠饥饿处理12~20 h,异氟烷吸入麻醉后眼眶取血3 000 r/min离心15 min,取上层血清,-20℃冰箱保存。打开腹腔,取小鼠肝脏,一部分肝组织予4%甲醛固定24 h后切片,剩余部分-80℃冰箱保存,用于后续分子生物学实验。

1.2.3 血清和肝脏生化指标、炎症因子检测

ELISA试剂盒室温放置至少30 min,按照说明书进行操作检测小鼠血清和肝组织生化指标丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、谷氨酰转移酶(glutamyl transferase, GGT)及炎症因子肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、白细胞介素6(interleukin-6, IL-6)、 γ -干扰素(interferon- γ , IFN- γ)水平。读取酶标仪450 nm波长处吸光度值,采用相应软件绘制标准曲线,得到各样品检测值。

1.2.4 小鼠肝组织病理学检查

小鼠部分肝组织多聚甲醛固定24 h,石蜡包埋、切片后行HE染色、油红O染色和天狼星红染色。组织切片由病理学专家读片。

1.2.5 肝原代细胞分离

8只C57BL/6J小鼠用于肝原代细胞分离,小鼠饥饿处理12~20 h,麻醉后开腹暴露门静脉,插入穿刺针固定,剪开下腔静脉,依次灌注含EGTA的无Ca²⁺、Mg²⁺ Hanks缓冲液30~40 mL和含IV型胶原酶有Ca²⁺、Mg²⁺ Hanks缓冲液30~40 mL,摘取肝脏移入培养基中剪碎,细胞筛网过滤未消化完全的组织块,40 g离心3 min×3次后,加入Percoll密度梯度离心,收集沉淀加入培养基培养细胞24 h,进行后续实验。

1.2.6 细胞培养

小鼠原代肝细胞和人肝癌细胞系HepG2在含10% FBS、100 U/mL青霉素和100 μ g/mL链霉素的DMEM培养基中培养。培养箱条件为加湿,37℃、5% CO₂。

1.2.7 细胞油红O染色

小鼠原代肝细胞和HepG2细胞以2×10⁵个/孔的密度接种于6孔板中,分为溶剂对照组(C组)、PA组、JTE-013组,C组予2 μ L DMSO,PA组细胞予

0.5 mmol/L PA诱导细胞脂肪变,JTE-013组细胞用10 μ mol/L JTE-013预处理30 min后予0.5 mmol/L PA,溶剂DMSO的终浓度均不超过1%。PA处理24 h后多聚甲醛固定细胞,油红O工作液室温条件下避光染色15 min,光镜观察。

1.2.8 转录组测序

HepG2细胞以4×10⁵个/孔的密度接种至6孔板中,待细胞汇合率50%~80%时,分别构建S1PR2的干扰、过表达质粒转染至HepG2细胞中,由华大基因科技有限公司行转录组测序寻找表达差异的基因。

1.2.9 蛋白免疫印迹实验

HepG2细胞接种于6孔板中分为溶剂对照组(C组)、PA组、JTE-013组,各组处理同1.2.7。PA处理30 min后加入细胞裂解液,超声离心后提取蛋白用于ERK、p-ERK和GAPDH表达分析,以ERK条带灰度值为对照计算p-ERK相对表达量,进行组间比较;PA处理24 h后加入细胞裂解液,超声离心后提取蛋白用于PCSK9、LDLR和GAPDH表达分析,以GAPDH条带灰度值为对照计算目的蛋白相对表达量,进行组间比较。小鼠肝组织置于RIPA裂解液中匀浆、离心后提取蛋白用于S1PR2、PCSK9、Egr1和 β -actin表达分析,以 β -actin条带灰度值为对照计算目的蛋白相对表达量,进行组间比较。准备好的蛋白样品用SDS-PAGE电泳分离后湿转法转至PVDF膜。5%BSA常温封闭后用目标蛋白抗体4℃孵育过夜。TBST洗脱后孵育辣根过氧化物酶标记的二抗,洗脱后显影。

1.3 统计学方法

应用SPSS20.0统计软件,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。使用 t 检验比较两组独立样本的差异,单因素方差分析和最小显著性差异法用于检验多组数据的差异。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

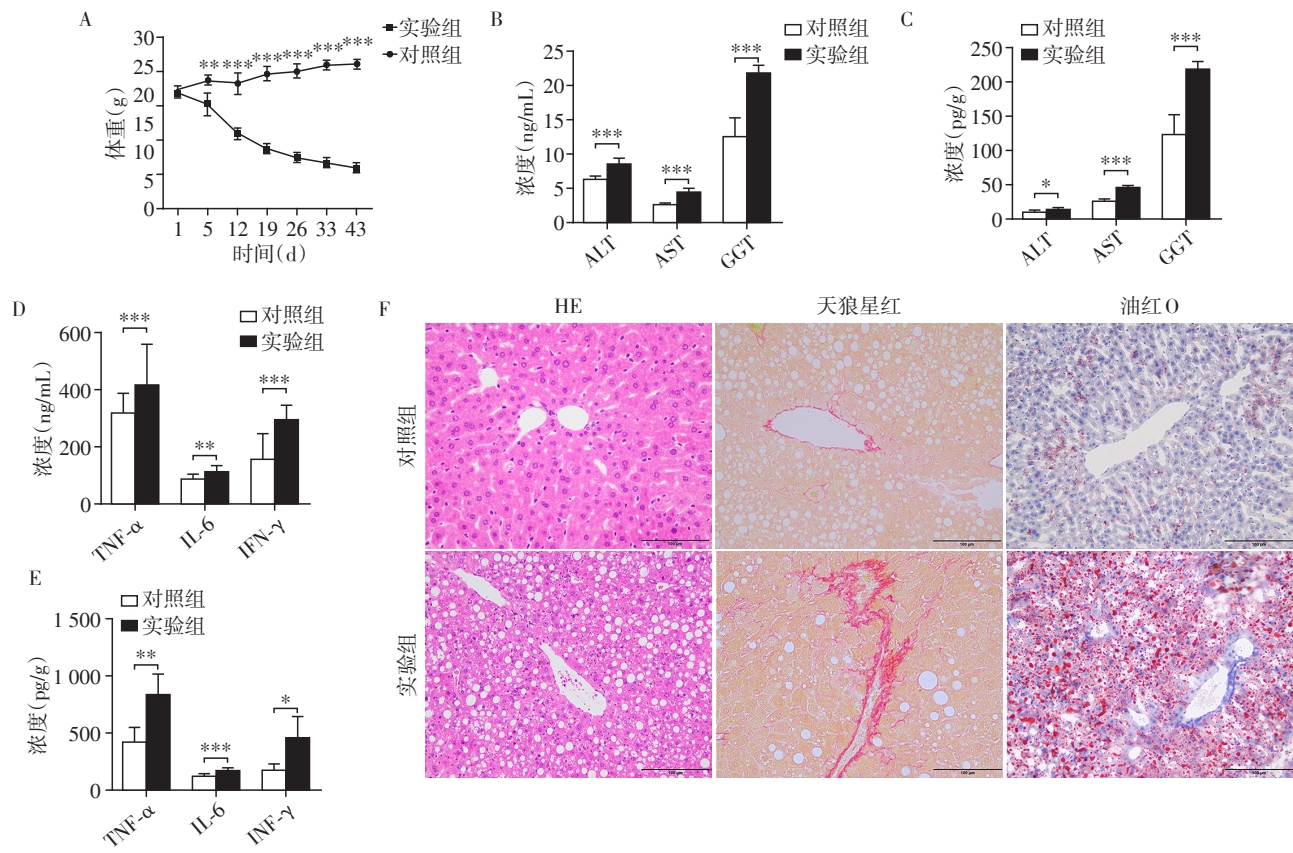
2 结果

2.1 血清、肝脏生化指标变化和肝组织病理学改变

NASH造模期间实验组小鼠体重明显下降(图1A),第6周末ELISA检测血清(图1B)和肝脏(图1C)生化指标ALT、AST、GGT水平,结果显示实验组小鼠指标较对照组明显升高,血清(图1D)和肝脏(图1E)炎症因子TNF- α 、IL-6、IFN- γ 水平也有相似改变,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。肝组织HE染色切片显示,实验组小鼠肝细胞气球样变、脂肪变,间质炎性细胞浸润。油红O染色可更明显地观

察到实验组小鼠肝内大颗粒脂滴沉积。天狼星红染色显示实验组小鼠肝内存在明显纤维化(图1F)。实验组小鼠较对照组小鼠存在明显的血清、肝脏炎症因子和生化指标升高,肝脏病理存在明显的脂质沉积、炎症和纤维化,通过MCD饮食我们得到了理想的NASH动物模型。

2.2 S1PR2/PCSK9在NASH小鼠中表达改变
为探究S1PR2/PCSK9在NASH模型小鼠中的表达,Western blot检测小鼠肝组织蛋白,实验结果显示造模6周后,小鼠肝脏S1PR2表达减少、PCSK9表达增加(图2),提示S1PR2/PCSK9可能参与NASH的发生发展过程。



A: 两组体重变化;B: 两组血清 ALT、AST、GGT 比较;C: 两组肝脏 ALT、AST、GGT 比较;D: 两组血清 TNF- α 、IL-6、IFN- γ 比较;E: 两组肝脏 TNF- α 、IL-6、IFN- γ 比较;F: 两组肝组织 HE 染色、油红 O 染色和天狼星红染色($\times 200$)。两组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$ ($n=6$)。

图1 小鼠血清、肝脏生化指标变化和肝组织病理学改变

Figure 1 Changes of serum and liver biochemical indexes and liver histopathology in mice

2.3 抑制S1PR2表达加重肝细胞异常脂质沉积
为验证S1PR2在肝细胞脂质沉积中的作用,分离培养小鼠原代肝细胞、HepG2细胞,PA诱导细胞脂肪变,予S1PR2抑制剂JTE-013处理后,油红O染色观察到JTE-013处理组细胞内脂质沉积增加(图3)。这提示S1PR2可能参与缓解肝细胞内的异常脂质沉积。

2.4 抑制S1PR2影响ERK磷酸化和PCSK9表达
进一步探究S1PR2是否会影响ERK磷酸化和PCSK9的表达。Western blot实验证明,使用S1PR2抑制剂JTE-013后,HepG2细胞ERK磷酸化水平增加(图4A、B),PCSK9表达增加,LDLR表达

减少(图4C、D)。

2.5 转录组测序发现新的靶点
构建S1PR2干扰、过表达质粒,分别转染HepG2细胞进行转录组测序,相较于对照组,过表达S1PR2后有65种基因发生改变,干扰S1PR2后有305种基因发生改变,27种基因在干扰、过表达时均有改变。其中,Egr1在干扰、过表达时变化趋势相反,在S1PR2过表达时增加,干扰时降低,进一步用免疫印迹实验在NASH模型实验组小鼠中检测蛋白表达情况,MCD造模6周后,小鼠肝脏Egr1减少(图5),为我们进一步研究S1PR2调节NASH脂质沉积和炎症的机制提供了新的思路。

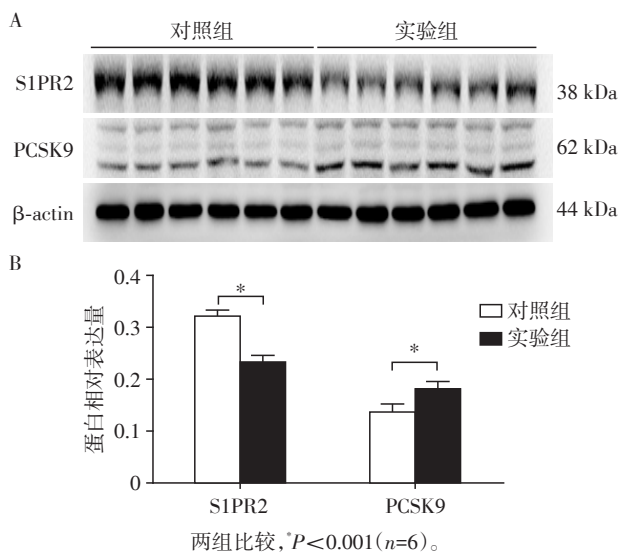


图2 造模6周后小鼠肝组织S1PR2/PCSK9表达改变
Figure 2 The altered expression of S1PR2/PCSK9 in mice liver after 6 weeks of modeling

3 讨论

NAFLD已成为全球越来越普遍的慢性肝脏疾

病,为社会带来沉重的经济负担^[14]。目前NAFLD的最佳治疗方案仍是调整生活方式,尚无针对NAFLD的有效治疗药物上市,提高NAFLD治疗药物的靶向性和有效性是急需解决的关键问题。NAFLD疾病早期尚可逆转,当疾病进展为NASH时患肝硬化、肝功能衰竭和肝癌的风险显著增加。

既往研究报道,S1PR2基因敲除小鼠在高脂饮食喂养以后,较野生型小鼠胰岛素抵抗减轻,成脂分化受到抑制^[15-16]。本研究在NASH模型动物中,发现S1PR2蛋白表达量减少,因此推测它在NASH发展过程中可能发挥了一定的保护作用。进一步研究发现在小鼠原代肝细胞和HepG2细胞中,使用S1PR2特异性抑制剂JTE-013,可加重PA诱导的细胞内脂质增多,这一结果提示S1PR2可能有抑制NASH发生发展的作用。

在NAFLD患者中,肝脏脂肪变性程度与循环中的PCSK9水平呈正相关^[17]。PCSK9是由肝脏产生的丝氨酸蛋白酶,与肝细胞表面的LDLR结合后使其降解,PCSK9抗体能干扰二者结合,使LDLR

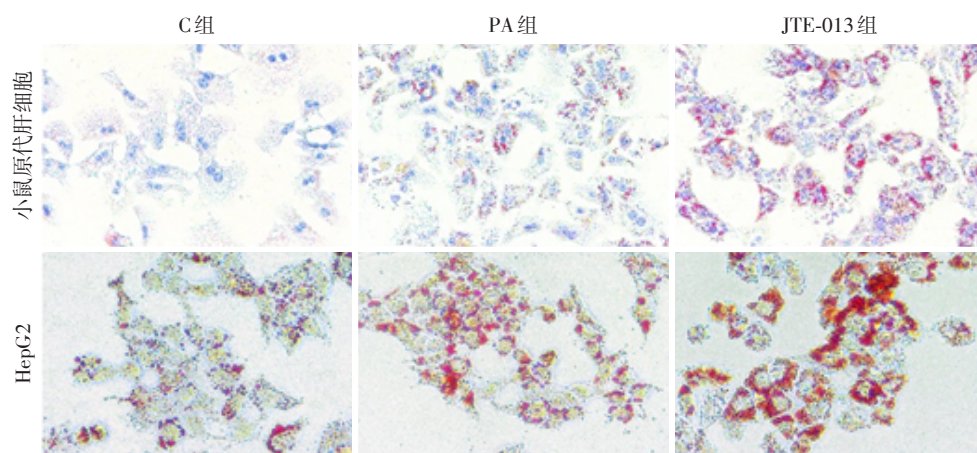
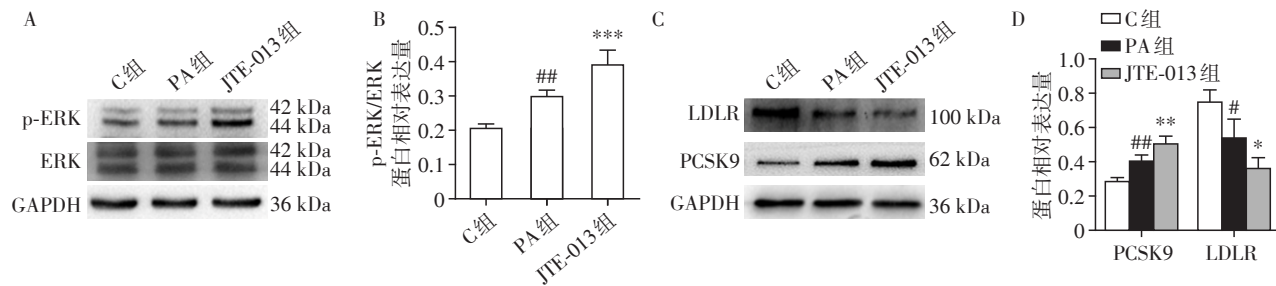


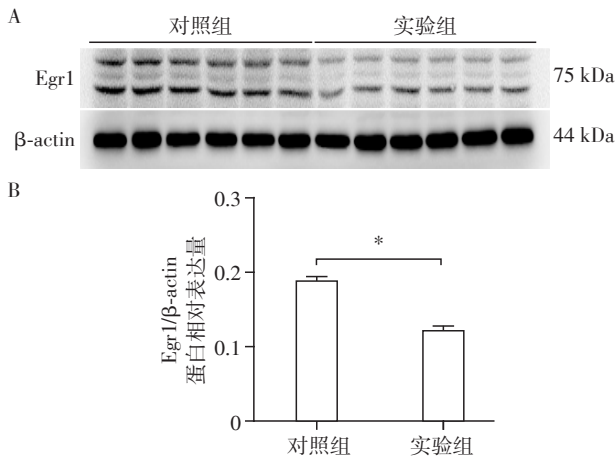
图3 抑制S1PR2表达加重肝细胞异常脂质沉积(油红O染色,×400)
Figure 3 Inhibition of S1PR2 expression aggravates lipid deposition in hepatocytes (oil red O staining, ×400)



A、B: Western blot检测(A)及定量分析(B)JTE-013影响ERK磷酸化;C、D: Western blot检测(C)及定量分析(D)JTE-013影响PCSK9、LDLR的蛋白表达。与PA组比较,*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001;与C组比较,*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 (n=3)。

图4 抑制S1PR2影响ERK磷酸化和PCSK9表达

Figure 4 Inhibition of S1PR2 affects the phosphorylation of ERK and expression of PCSK9



A:蛋白质免疫印迹实验检测 Egr1 表达($n=6$)。B:半定量分析结果。两组比较, $*P<0.001(n=6)$ 。

图5 基因检测发现新的靶点 Egr1 在两组小鼠肝脏组织的表达

Figure 5 Egr1 expression in mice liver of two groups, which was a new target by gene detection

表达增加从而降低循环中 LDL-C 水平^[18-19]。体外研究也表明白藜芦醇可通过抑制 PCSK9 表达减轻细胞脂质沉积^[20]。本研究发现,抑制 S1PR2 后 ERK 磷酸化水平增加,同时 PCSK9 表达水平升高,而 LDLR 表达水平降低。这提示 S1PR2 参与调节 NASH 的机制可能与其在炎症状态下被抑制后促进 PCSK9 表达,降低 LDLR 表达有关,其中 S1PR2、PCSK9 和 LDLR 之间的具体调控机制尚待后续实验探究。

我们进一步通过转录组测序,发现在转染 S1PR2 干扰、过表达质粒的 HepG2 细胞中,共有 343 种基因发生改变,过表达 S1PR2 后有 65 种基因发生改变,干扰 S1PR2 后有 305 种基因发生改变,27 种基因在干扰、过表达时均有改变。其中, Egr1 在干扰、过表达时变化趋势相反,在 S1PR2 过表达时增加,干扰时降低。Egr1 是一种抑癌基因编码的蛋白质,属于 C2H2 型锌指蛋白,作为转录调节因子激活的靶基因产物,调节分化和有丝分裂等过程。进一步用免疫印迹实验在 NASH 模型小鼠中检测蛋白表达情况,造模后小鼠 Egr1 表达减少,表明除 PCSK9 外, S1PR2 也可能通过 Egr1 调控 NASH 脂质沉积。我们将在后续的实验深入研究中。

综上,本研究发现 S1PR2 参与 NASH 的脂质沉积和炎症损伤过程,这可能与炎症状态下 S1PR2 被抑制后可上调 ERK 磷酸化水平,进一步激活 PCSK9,最终抑制 LDLR 表达有关,对未来深入研究 NASH 发病机制,寻找治疗新靶点有一定意义。

【参考文献】

[1] ESTES C, ANSTEE Q M, ARIAS-LOSTE M T, et al. Modeling NAFLD disease burden in China, France, Germany, Italy, Japan, Spain, United Kingdom, and United States for the period 2016-2030 [J]. J Hepatol, 2018, 69 (4):896-904

[2] DIEHL A M, CAUSE D C. Pathogenesis, and treatment of nonalcoholic steatohepatitis [J]. N Engl J Med, 2017, 377 (21):2063-2072

[3] CHALASANI N, YOUNOSSI Z, LAVINE J E, et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: practice guidance from the American association for the study of liver diseases [J]. Hepatology, 2018, 67 (1):328-357

[4] LIU R, ZHAO R, ZHOU X, et al. Conjugated bile acids promote cholangiocarcinoma cell invasive growth through activation of sphingosine 1-phosphate receptor 2 [J]. Hepatology, 2014, 60(3):908-918

[5] 张园园,严君君,张 培,等. 黄连素调节肠道菌群减轻非酒精性脂肪性肝病肝脏炎症的实验研究[J]. 胃肠病学, 2018, 23(4):209-215

[6] NAGAHASHI M, TAKABE K, LIU R, et al. Conjugated bile acid-activated S1P receptor 2 is a key regulator of sphingosine kinase 2 and hepatic gene expression [J]. Hepatology, 2015, 61(4):1216-1226

[7] FYRST H, SABA J D. An update on sphingosine-1-phosphate and other sphingolipid mediators [J]. Nat Chem Biol, 2010, 6(7):489-497

[8] FRIEDMAN S L, NEUSCHWANDER -TETRI B A, RINELLA M, et al. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies [J]. Nat Med, 2018, 24 (7): 908-922

[9] 张子婷,叶卓森,陈永欣. AMPK 信号通路在非酒精性脂肪肝病中的研究进展[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2019, 39(8):1252-1256

[10] MIN H K, KAPOOR A, FUCHS M, et al. Increased hepatic synthesis and dysregulation of cholesterol metabolism is associated with the severity of nonalcoholic fatty liver disease[J]. Cell Metab, 2012, 15(5):665-674

[11] MBIKAY M, SIROIS F, MAYNE J, et al. PCSK9-deficient mice exhibit impaired glucose tolerance and pancreatic islet abnormalities [J]. FEBS Lett, 2010, 584 (4): 701-706

[12] LEBEAU P F, BYUN J H, PLATKO K, et al. Pcsk9 knock-out exacerbates diet-induced non-alcoholic steatohepatitis, fibrosis and liver injury in mice [J]. JHEP Rep, 2019, 1(6):418-429

(下转第 845 页)

- [J]. Clin Cancer Res, 2014, 20(12):3299-3309
- [6] GOKE F, FRANZEN A, HINZ T K, et al. FGFR1 expression levels predict BGJ398 sensitivity of FGFR1-dependent head and neck squamous cell cancers [J]. Clin Cancer Res, 2015, 21(19):4356-4364
- [7] XIAO X Y, LANG X P. Correlation between MMP-7 and bFGF expressions in non-small cell lung cancer tissue and clinicopathologic features [J]. Cell Biochem Biophys, 2015, 73(2):427-432
- [8] TSUNODA S, NAKAMURA T, SAKURAI H, et al. Fibroblast growth factor-2-induced host stroma reaction during initial tumor growth promotes progression of mouse melanoma via vascular endothelial growth factor A-dependent neovascularization [J]. Cancer Sci, 2007, 98(4):541-548
- [9] PU D, LIU J, LI Z, et al. Fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1), partly related to vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) and microvessel density, is an independent prognostic factor for non-small cell lung cancer [J]. Med Sci Monit, 2017, 23:247-257
- [10] 辛丽红,李雅莉. 原位PCR技术检测PTEN基因DNA在肺癌中的表达 [J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2011, 31(9):1270-1273
- [11] TAO D, HAN X, ZHANG N, et al. Genetic alteration profiling of patients with resected squamous cell lung carcinomas [J]. Oncotarget, 2016, 7(24):36590-36601
- [12] COWELL J K, QIN H, HU T, et al. Mutation in the FGFR1 tyrosine kinase domain or inactivation of PTEN is associated with acquired resistance to FGFR inhibitors in FGFR1-driven leukemia/lymphomas [J]. Inter J Cancer, 2017, 141(9):1822-1829
- [13] 周永芳,王 萌,闫 安,等. FGFR1和IGF1R在肺鳞癌中的表达及其临床意义 [J]. 临床肿瘤学杂志, 2014, (12):1086-1090
- [14] 潘天宇,张华伟. 成纤维细胞生长因子受体1和血管内皮生长因子在肺鳞癌中的表达及与预后的关系 [J]. 癌症进展, 2017, 15(3):315-317
- [15] 付俊青,哈敏文. FGFR1和VEGF在肺鳞癌中的表达及其对预后影响 [J]. 医学与哲学, 2016, 37(8):67-70
- [16] 张 伟,李晓杰,徐香云,等. bFGF、FGFR1在肺鳞癌组织中的表达及临床意义 [J]. 湘南学院学报(医学版), 2014(4):1-5
- [17] 张 静. FGFR1、PTEN在肺鳞癌的表达及临床意义 [D]. 哈尔滨:哈尔滨医科大学肿瘤学, 2014
- [18] KOHLER LH, MIRESKANDARI M, KNOSEL T, et al. FGFR1 expression and gene copy numbers in human lung cancer [J]. Virchows Arch, 2012, 461(1):49-57
- [19] HU M, HU Y, HE J, et al. Prognostic value of basic fibroblast growth factor(bFGF) in lung cancer: a systematic review with meta-analysis [J]. PLoS One, 2016, 11(1): e147374
- [20] LI X, YANG Y, ZHANG H, et al. High levels of phosphatase and tensin homolog expression predict favorable prognosis in patients with non-small cell lung cancer [J]. Cell Biochem Biophys, 2015, 73(3):631-637
- [21] PEREZ-RAMIREZ C, CANADAS-GARRE M, MOLINA M A, et al. PTEN and PI3K/AKT in non-small-cell lung cancer [J]. Pharmacogenomics, 2015, 16(16):1843-1862
- [22] 谭永刚,许 宁,张贺英. 非小细胞肺癌组织FGFR1OP和PTEN表达及其临床意义的研究 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2008, 15(20):1561-1563
- [收稿日期] 2019-08-12

(上接第815页)

- [13] OCHIN C C, GARELNABI M. Berberine encapsulated PLGA-PEG nanoparticles modulate PCSK-9 in HepG2 cells [J]. Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets, 2018, 18(1):61-70
- [14] YOUNOSSI Z M. Non-alcoholic fatty liver disease: a global public health perspective [J]. J Hepatol, 2019, 70(3):531-544
- [15] KITADA Y, KAJITA K, TAGUCHI K, et al. Blockade of sphingosine 1-phosphate receptor 2 signaling attenuates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and systemic glucose intolerance in mice [J]. Endocrinology, 2016, 157(5):1839-1851
- [16] PROIA R L, HLA T. Emerging biology of sphingosine-1-phosphate: its role in pathogenesis and therapy [J]. J Clin Invest, 2015, 125(4):1379-1387
- [17] RUSCICA M, FERRI N, MACCHI C, et al. Liver fat accumulation is associated with circulating PCSK9 [J]. Ann Med, 2016, 48(5):384-391
- [18] PASTA A, CREMONINI A L, PISCIOTTA L, et al. PCSK9 inhibitors for treating hypercholesterolemia [J]. Expert Opin Pharmacother, 2020, 21(3):353-363
- [19] 崔 琴,支晓明,郭 雯,等. 体检人群血清PCSK9与代谢综合征的相关性分析 [J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2019, 39(2):259-261
- [20] JING Y, HU T, LIN C, et al. Resveratrol downregulates PCSK9 expression and attenuates steatosis through estrogen receptor alpha-mediated pathway in LO2 cells [J]. Eur J Pharmacol, 2019, 855:216-226
- [收稿日期] 2020-02-25