

Myriocin 抑制脂质诱导的整合应激反应延缓 *ApoE*^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化进展研究

于泽谋 李永超 郝洪军 黄一宁 彭清

【摘要】目的 探讨 Myriocin 对高脂饮食诱导的整合应激反应的影响及作用机制。**方法** 18 只 *ApoE*^{-/-} 小鼠随机分为高脂饮食 + 磷酸盐缓冲液 (对照组, 9 只) 或高脂饮食 + 磷酸盐缓冲液 + Myriocin (Myriocin 组, 9 只) 两组, 12 周后测定血清脂质 [总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C)、极低密度脂蛋白胆固醇和高密度脂蛋白胆固醇], 流式细胞术测定淋巴细胞抗原 6 复合体 (Ly-6c)^{high} 亚型单核细胞比例, HE 染色测定主动脉粥样斑块和脂质坏死核相对面积, 免疫荧光染色观察单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1) 表达, 实时荧光定量聚合酶链反应 (PCR) 测定炎症反应相关分子 [炎症因子白细胞介素-1 β 和 6 (IL-1 β 和 IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、细胞间黏附分子-1 (ICAM-1)、血管内皮生长因子 (VEGF)、血管细胞黏附分子-1 (VCAM-1) 和抗炎因子 IL-10] 和整合应激反应相关分子 [葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78)、蛋白激酶 R 样内质网激酶 (PERK)、真核翻译起始因子 2 α (eIF2 α)、活化转录激活因子 4 和 6 (ATF4 和 ATF6)、内质网应激相关促凋亡蛋白 C/EBP 同源蛋白 (CHOP) 和 Caspase12] mRNA 表达, Western blotting 法测定整合应激反应相关蛋白 [eIF2 α 、ATF4、肌醇依赖酶 1 α (IRE1 α) 和磷酸化 IRE1 α 、p65 核因子- κ B (NF- κ B) 和磷酸化 p65 NF- κ B、Caspase12 和活化型 Caspase12] 表达水平。**结果** (1) 经 Myriocin 灌胃 12 周后, 小鼠血清 LDL-C 水平降低 ($t = 2.830, P = 0.012$)。(2) 流式细胞术分析, 经 Myriocin 灌胃 8 周后, 小鼠 Ly-6c^{high} 亚群单核细胞比例下降 ($t = 2.866, P = 0.011$)。(3) HE 染色观察, Myriocin 组小鼠粥样斑块面积小于对照组, 在距主动脉瓣 200 和 300 μ m 处, Myriocin 组斑块面积小于对照组 ($t = 2.281, P = 0.045; t = 3.506, P = 0.003$), Myriocin 组小鼠脂质坏死核相对面积亦小于对照组 ($Z = -2.870, P = 0.004$)。(4) 免疫荧光染色观察, Myriocin 组小鼠 MCP-1 水平低于对照组。实时荧光定量 PCR 显示, Myriocin 组小鼠 IL-1 β mRNA ($t = 3.968, P = 0.005$)、TNF- α mRNA ($t = 7.696, P = 0.000$)、ICAM-1 mRNA ($t = 3.294, P = 0.013$)、VCAM-1 mRNA ($t = 5.449, P = 0.001$) 和 VEGF mRNA ($t = 2.574, P = 0.037$) 表达均降低, IL-10 mRNA 升高 ($t = -3.132, P = 0.017$)。(5) 实时荧光定量 PCR 显示, Myriocin 组小鼠 PERK mRNA ($t = 4.174, P = 0.004$)、eIF2 α mRNA ($Z = -2.692, P = 0.007$)、ATF4 mRNA ($t = 3.342, P = 0.012$)、ATF6 mRNA ($t = 5.841, P = 0.001$) 和 Caspase12 mRNA ($t = 7.270, P = 0.000$) 表达降低。(6) Western blotting 检测, Myriocin 组小鼠 eIF2 α ($t = 2.175, P = 0.047$)、ATF4 ($t = 2.923, P = 0.011$) 和磷酸化 p65 NF- κ B/总 p65 NF- κ B 比值 ($t = 2.909, P = 0.011$) 下降。**结论** 鞘脂抑制剂 Myriocin 可以抑制高脂饮食诱导的整合应激反应和炎症反应, 延缓 *ApoE*^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化进展。

【关键词】 动脉粥样硬化; 髓磷脂蛋白质类; 炎症; 流式细胞术; 聚合酶链反应; 免疫印迹法; 疾病模型, 动物

Myriocin reduces atherosclerosis in *ApoE*^{-/-} mice by inhibiting lipid - induced integrated stress response

YU Ze-mou¹, LI Yong-chao², HAO Hong-jun¹, HUANG Yi-ning¹, PENG Qing¹

doi: 10.3969/j.issn.1672-6731.2020.10.003

基金项目: 北京大学医学青年科技创新平台发展基金资助项目 (项目编号: BMU2017MC005)

作者单位: 100034 北京大学第一医院神经内科 (于泽谋, 郝洪军, 黄一宁, 彭清); 102218 清华大学附属北京清华长庚医院心脏外科 (李永超)

于泽谋与李永超对本文有同等贡献

通讯作者: 彭清, Email: qing054@sina.com

¹Department of Neurology, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China

²Department of Cardiac Surgery, Beijing Tsinghua Changgung Hospital, School of Clinical Medicine, Tsinghua University, Beijing 102218, China

YU Ze-mou and LI Yong-chao contributed equally to the article

Corresponding author: PENG Qing (Email: qing054@sina.com)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of Myriocin on high fat diet induced integrated stress response and further explore the mechanism. **Methods** A total of 18 *ApoE*^{-/-} mice were fed a high-fat diet and randomly divided into control group (n = 9, phosphate buffer solution) and Myriocin group (n = 9, phosphate buffer solution + Myriocin). The drugs were administered orally for 12 weeks. Serum lipids [total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low density lipoprotein-cholesterol (LDL-C), very low density lipoprotein-cholesterol (VLDL-C) and high density lipoprotein-cholesterol (HDL-C)] were measured. Flow-cytometric analysis was used to determine the proportion of lymphocyte antigen 6 complex (Ly-6c)^{high} phenotype monocytes. HE staining was performed to compare the size and detailed composition of atherosclerotic plaques and immunofluorescence staining was used to observe the expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (PCR) was used to detect the mRNA expression levels of inflammation related molecules [including pro-inflammatory factors, interleukin-1 β and 6 (IL-1 β and IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), vascular endothelial growth factor (VEGF) and anti-inflammatory factor, IL-10]. In addition, the mRNA expression levels of integrated stress response related molecules [including glucose regulated protein 78 (GRP78), protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase (PERK), eukaryotic translation initiation factor 2 α (eIF2 α), activating transcription factor 4 and 6 (ATF4 and ATF6), endoplasmic reticulum stress-related apoptosis protein C/EBP homologous protein (CHOP) and Caspase12] were tested. The expression levels of integrated stress response related protein [including eIF2 α , ATF4, inositol-requiring enzyme 1 α (IRE1 α) and phosphorylated IRE1 α , p65 nuclear factor- κ B (p65 NF- κ B) and phosphorylated p65 NF- κ B, Caspase12 and cleaved Caspase12] were explored by Western blotting. **Results** 1) Treatment with Myriocin led to lower level of serum LDL-C ($t = 2.830$, $P = 0.012$). 2) Myriocin suppressed monocytes differentiating toward a Ly-6c^{high} phenotype ($t = 2.866$, $P = 0.011$). 3) HE staining showed less atherosclerotic lesions at 200 and 300 μ m distance away from the aortic valve ($t = 2.281$, $P = 0.045$; $t = 3.506$, $P = 0.003$) and less necrotic core areas ($Z = -2.870$, $P = 0.004$) in the Myriocin group. 4) Immunofluorescence staining showed the reduction of MCP-1 protein expression in the Myriocin group; real-time fluorescence quantitative PCR showed that IL-1 β mRNA ($t = 3.968$, $P = 0.005$), TNF α mRNA ($t = 7.696$, $P = 0.000$), ICAM mRNA ($t = 3.294$, $P = 0.013$), VCAM mRNA ($t = 5.449$, $P = 0.001$) and VEGF mRNA ($t = 2.574$, $P = 0.037$) were generally decreased in the Myriocin group, while IL-10 mRNA was increased ($t = -3.132$, $P = 0.017$) in the Myriocin group. 5) Myriocin downregulated PERK mRNA ($t = 4.174$, $P = 0.004$), eIF2 α mRNA ($Z = -2.692$, $P = 0.007$), ATF4 mRNA ($t = 3.342$, $P = 0.012$), ATF6 mRNA ($t = 5.841$, $P = 0.001$) and Caspase12 mRNA ($t = 7.270$, $P = 0.000$). 6) Western blotting showed that Myriocin suppressed the protein expression of eIF2 α ($t = 2.175$, $P = 0.047$) and ATF4 ($t = 2.923$, $P = 0.011$), and the phosphorylation of p65 NF- κ B ($t = 2.909$, $P = 0.011$). **Conclusions** Myriocin could alleviate atherosclerosis progression of *ApoE*^{-/-} mice by reducing integrated stress response and inflammatory response in the arterial walls.

【Key words】 Atherosclerosis; Myelin proteins; Inflammation; Flow cytometry; Polymerase chain reaction; Immunoblotting; Disease models, animal

This study was supported by the Fundamental Research Funds for the Central Universities, Peking University Medicine Seed Fund for Interdisciplinary Research (No. BMU2017MC005).

Conflicts of interest: none declared

有研究显示,整合应激反应与代谢性疾病和动脉粥样硬化密切相关^[1]。整合应激反应系指真核生物受到不同刺激后,触发真核翻译起始因子 2 α (eIF2 α) 在丝氨酸第 51 位点磷酸化而介导的细胞适应性反应^[2],但持续性整合应激反应或严重应激反应则可诱发细胞凋亡。研究显示,高脂饮食可使细胞摄取过多脂质而致内质网发生应激反应^[3],而蛋

白激酶 R 样内质网激酶 (PERK) 通过与未折叠蛋白相结合激活 eIF2 α ,进而诱发整合应激反应。在动脉粥样硬化形成的过程中,整合应激反应具有促进炎症小体形成和炎症因子释放的作用^[1],且持续存在并贯穿于粥样硬化斑块(以下简称斑块)发生发展之全过程^[4],抑制该反应可减少泡沫细胞形成、抑制炎症反应,从而延缓动脉粥样硬化进展^[5]。本课

题组前期研究显示,丝氨酸棕榈酰转移酶(SPT)抑制剂 Myriocin 可以延缓动脉粥样硬化进展,但其潜在作用机制尚未阐明^[6]。本研究旨在探索 Myriocin 对血管整合应激反应的作用。

材料与方 法

一、实验材料

1. 实验动物 基因背景为 C57BL/6J 雄性无特定病原体(SPF)级载脂蛋白 E 基因敲除(*ApoE*^{-/-})小鼠共 18 只,11 周龄,购自北京维通利华实验动物技术有限公司[合格证号:SCXK(京)2016-0006],饲养于北京大学第一医院实验动物中心,温度 18~22℃、湿度 50%~60%,12 h 昼-12 h 夜循环照明,适应性喂养 1 周后予高脂饲料(21%猪油+0.15%胆固醇,4.554 kCal/g,购自北京科奥协力饲料有限公司)喂养。动物实验操作过程严格遵循北京大学第一医院伦理委员会制定的规章制度(决议号:J201818)。

2. 试剂与仪器 (1)药品与试剂:Myriocin 和红细胞裂解液购自美国 Sigma 公司和 Beckman Coulter 公司。别藻蓝蛋白(APC)标记的 CD115 抗体和藻红蛋白(PE)标记的淋巴细胞抗原 6 复合体(Ly-6c)抗体(均 1:100)由美国 Ebioscience 公司提供;TRIzol 试剂为美国 Life Technologies 公司产品,引物序列由北京天一辉远生物科技有限公司合成,TransScript First-Strand cDNA Synthesis SuperMix 和 TransStart Top Green qPCR SuperMix 购自北京全式金生物技术有限公司;RIPA 裂解液由北京普利莱基因技术公司提供,二辛可宁酸(BCA)检测试剂盒为美国 Thermo Pierce 公司产品,ECL 发光液购自美国 Millipore 公司,I 抗工作液主要包括 eIF2 α 、肌醇依赖酶 1 α (IRE1 α)、活化转录激活因子 4(ATF4)、p65 核因子- κ B(p65 NF- κ B)和磷酸化 p65 NF- κ B 抗体(均 1:1000)购自美国 CST 公司,磷酸化 IRE1 α 抗体(1:1000)购自美国 Thermo 公司,Caspase12 抗体(1:1000)购自英国 Abcam 公司,单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)抗体(1:100)购自美国 Proteintech 公司,辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔 IgG II 抗(1:5000)由北京中杉金桥生物技术有限公司提供,Alexa Fluor 488 标记的山羊抗兔 IgG II 抗(1:1000)为美国 Jackson Immuno Research 公司产品。(2)设备与仪器:FACSCalibur™ 流式细胞仪购自美国 BD 公司,全自动生化分析仪由美国 Beckman 公司提供,石

蜡切片机为德国 Leica 公司产品,聚合酶链反应(PCR)仪购自美国 Applied Biosystem 公司,实时荧光定量 PCR 系统(CEX Connect Real-Time System)由美国 Bio-Rad 公司提供,GBOX-CHEMI-XT4 型曝光仪为美国 Syngen 公司产品,Eclipse Ti2 型光学显微镜和 A1MP 型荧光共聚焦显微镜购自日本 Nikon 公司。

二、实验方法

1. 实验动物分组 18 只 *ApoE*^{-/-} 小鼠适应性喂养 1 周后,于 12 周龄时予高脂饲料和灌胃处理,采用随机数字表法随机分为两组,对照组予以磷酸盐缓冲液+5% Tween 80 灌胃,Myriocin 组予以 Myriocin 0.30 mg/(kg·d)^[7]溶于磷酸盐缓冲液+5% Tween 80 灌胃,灌胃容积均为 100 μ l/d,以免引起小鼠胃部不适或影响进食,持续喂养 12 周。

2. 血清脂质测定 高脂饮食和灌胃处理 12 周后,摘眼球采血约 800 μ l,4℃静置 2~3 h,2737 \times g 离心 15 min。取上清液约 200 μ l,由北京大学第一医院检验科完成血清脂质[包括总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、极低密度脂蛋白胆固醇(VLDL-C)和高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)]测定。

3. 流式细胞术检测单核细胞亚群比例 乙二胺四乙酸(EDTA)包被的 EP 管中加入预冷磷酸盐缓冲液 400 μ l;高脂饮食和灌胃处理 8 周后即小鼠 20 周龄时,于尾静脉采血约 100 μ l;滴加 APC 标记的 CD115 抗体(1:100)和 PE 标记的 Ly-6c 抗体(1:100)各 5 μ l,设立同型对照管,室温孵育约 30 min;1173 \times g 离心 5 min,弃上清液;滴加红细胞裂解液 600 μ l,振荡混匀,相同条件离心 5 min,弃上清液;滴加磷酸盐缓冲液 1 ml、振荡重悬,相同条件下离心 5 min,弃上清液,重复操作一遍;最后滴加磷酸盐缓冲液 200 μ l、重悬,1 h 内上机行流式细胞术检测,采用 FlowJo 流式细胞分析软件计算 Ly-6c^{high} 亚型单核细胞比例。

4. HE 染色和免疫荧光染色 以冷生理盐水灌注小鼠心脏,平行左右心耳连线下方约 0.50 cm 处切开心脏,将心脏基部连同升主动脉置于 4%多聚甲醛溶液固定 24 h;石蜡包埋,对主动脉窦部连续切片,层厚为 4 μ m,脱蜡、水化。(1)HE 染色:苏木素染细胞核 4 min、伊红染色 2 min,脱水、透明、封片;采用 Image-Pro Plus 图像分析软件定量测定主动脉斑块面积,为避免切片角度带来的误差,计算斑块相

对面积[斑块相对面积(%) = 主动脉斑块面积 / 主动脉窦管腔面积 × 100%]。(2) 免疫荧光染色: 切片置于 pH 值为 9 的抗原修复液中, 94 °C 水浴 15 min, 10% 山羊血清封闭, 室温孵育 1 h, 滴加 MCP-1 抗体(1 : 100) 200 μl, 4 °C 湿盒内过夜孵育, 磷酸盐缓冲液冲洗 5 min (×5 次), 滴加 Alexa Fluor 488 标记的山羊抗兔 IgG II 抗(1 : 1000) 200 μl, 37 °C 湿盒内孵育 30 min, DEPI 封片液封片, 于荧光共聚焦显微镜下观察 MCP-1 阳性率, 呈绿色荧光为 MCP-1 表达阳性。

5. 实时荧光定量聚合酶链反应检测炎症反应和整合应激反应相关分子 mRNA 的表达 冷生理盐水灌注小鼠心脏, 剥离主动脉、腹主动脉至髂总动脉, 分为两段, 将下段血管组织置于不含 RNA 酶 EP 管中, 迅速转移至液氮中, 再至 -80 °C 冰箱保存; 冰上匀浆组织, 提取总 RNA 10 μg, 建立逆转录反应体系, 获得 cDNA; 建立荧光定量 PCR 反应体系, 引物序列见表 1, 反应总体积 20 μl, 包括 Template 1 μl, 10 μmol/L 正向引物和逆向引物各 0.50 μl, 2 × TransStart Top Green qPCR SuperMix 10 μl, RNase-free Water 8 μl; 反应条件为 95 °C 预热 10 min、94 °C 变性 5 s、60 °C 退火 40 s、65 °C 延伸 5 s, 共 40 个循环。以 β-肌动蛋白(β-actin)为内参照物, 采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算炎症反应和整合应激反应相关分子 mRNA 相对表达量。炎症反应相关分子包括炎症因子白细胞介素-1β 和 6(IL-1β 和 IL-6)、肿瘤坏死因子-α (TNF-α)、细胞间黏附分子-1(ICAM-1)、血管细胞黏附分子-1(VCAM-1)、血管内皮生长因子(VEGF), 以及抗炎性因子 IL-10; 整合应激反应相关分子包括葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78)、PERK、eIF2α、ATF4、ATF6、内质网应激相关促凋亡蛋白 C/EBP 同源蛋白 (CHOP) 和 Caspase12。

6. Western blotting 法检测整合应激反应相关蛋白表达变化 提取血管组织总蛋白, BCA 法测定蛋白总量; 行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 电压 150 V、持续时间 40 min; 蛋白质转移至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜, 恒流 200 mA、持续 120 min; 5% 脱脂牛奶, 室温封闭 1 h; 滴加 eIF2α、ATF4、IRE1α 和磷酸化 IRE1α、p65 NF-κB 和磷酸化 p65 NF-κB、Caspase12 (均 1 : 1000) 5 ml, 4 °C 摇床过

表 1 实时荧光定量 PCR 反应引物序列

Table 1. Gene-specific primers

基因	正向引物序列(5'-3')	反向引物序列(5'-3')
<i>IL-1β</i>	CTTCCCGTGGACCTT	ATCTCGGAGCCTGTAGTG
<i>IL-6</i>	ATTCCTCTGGCTTCTGG	TGGTCTGGCTCTAGCC
<i>TNF-α</i>	TCTCATTCTGCTTGTGG	ACTTGGTGGTTTGCTACG
<i>ICAM-1</i>	CCATCACCGTATTTCGT	CTGGCGGCTCAGTATCT
<i>VCAM-1</i>	GATAGACAGCCCACTAAACG	CAATGACGGGAGTAAAGGT
<i>VEGF</i>	AACGATGAAGCCCTGGAGTG	CTTTGTTCTGTCTTTTGGTCTG
<i>IL-10</i>	TGAATTCCTGGGTGAGAAG	CTCTTCACCTGCCTCCACTGC
<i>PERK</i>	GCACTTTAGATGGACGAATCGC	TGCTGAGGCTAGATGAAACCA
<i>eIF2α</i>	AAACTGGAGCATGTTTGAATCG	GGGCACCTTTACTTCCTGGG
<i>CHOP</i>	CTCCAGATTCCAGTCAGAGTTC	ACTCTGTTTCCGTTTCTAGTT
<i>Caspase12</i>	TGGCCCATGAATCACATCTAAT	TGGACAAAAGTTCAGTGTATCT
<i>ATF4</i>	AGAGCGGAACAGGTCCATGT	CGAAGTCAAACCTTTTCAGATCCATT
<i>ATF6</i>	GGACGAGGTGCTGTCAGAG	GGACGAGGTGCTGTCAGAG
<i>GRP78</i>	ACCCTTACTCGGGCCAAATT	AGAGCGGAACAGGTCCATGT

夜孵育, TBST 缓冲液洗涤 5 min (×5 次), 滴加辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG II 抗(1 : 5000); 滴加 ECL 发光液, 自动曝光成像。以 β-肌动蛋白或者 α-微管蛋白(α-tubulin)为内参照物, 采用 Image J 软件计算目的蛋白相对表达量。

三、统计分析方法

采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据处理与分析。采用 Levene 方差齐性检验检测方差齐性, 呈正态分布的计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用两独立样本的 *t* 检验; 呈非正态分布的计量资料以中位数和四分位数间距 [$M(P_{25}, P_{75})$] 表示, 采用 Mann-Whitney *U* 检验。以 $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

经 Myriocin 灌胃 12 周后, 小鼠血清 LDL-C 水平低于对照组且差异有统计学意义 ($P = 0.012$), 而 TC、TG、VLDL-C 和 HDL-C 水平与对照组差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$, 表 2)。

流式细胞术分析, 经 Myriocin 灌胃 8 周后小鼠 Ly-6c^{high} 亚群单核细胞比例低于对照组且差异有统计学意义 ($P = 0.011$, 表 3)。

HE 染色显示, 所有小鼠主动脉窦均发生动脉粥样硬化, 但 Myriocin 组斑块面积小于对照组 (图 1)。进一步定量分析, 距主动脉瓣 200 和 300 μm 处, Myriocin 组小鼠斑块面积小于对照组且差异有

表 2 Myriocin 组与对照组小鼠血清脂质水平的比较($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

Table 2. Comparison of serum lipids between Myriocin group and control group ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

组别	例数	TC	TG	LDL-C	VLDL-C	HDL-C
对照组	9	43.48 ± 2.87	1.01 ± 0.20	9.96 ± 1.03	32.09 ± 2.05	1.44 ± 0.36
Myriocin 组	9	37.87 ± 10.26	1.22 ± 0.34	8.52 ± 1.12	28.18 ± 9.64	1.16 ± 0.36
<i>t</i> 值		1.581	-1.572	2.830	1.190	1.579
<i>P</i> 值		0.147	0.135	0.012	0.265	0.134

TC, total cholesterol, 总胆固醇; TG, triglyceride, 甘油三酯; LDL-C, low density lipoprotein-cholesterol, 低密度脂蛋白胆固醇; VLDL-C, very low density lipoprotein-cholesterol, 极低密度脂蛋白胆固醇; HDL-C, high density lipoprotein-cholesterol, 高密度脂蛋白胆固醇

表 3 Myriocin 组与对照组小鼠灌胃 8 周后 Ly-6c^{high} 亚型单核细胞比例的比较($\bar{x} \pm s$, %)

Table 3. Comparison of the percentage of Ly-6c^{high} monocytes among total monocytes between Myriocin group and control group ($\bar{x} \pm s$, %)

组别	例数	灌胃 8 周后	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
对照组	9	61.49 ± 10.69	2.866	0.011
Myriocin 组	9	49.57 ± 6.44		

统计学意义($P = 0.045, 0.003$; 表 4)。脂质坏死核是易损斑块的特征, Myriocin 组小鼠主动脉粥样硬化坏死核相对面积小于对照组($P = 0.004$), 表明 Myriocin 可有效抑制动脉粥样硬化进展(表 5)。

免疫荧光染色显示, 小鼠主动脉粥样斑块内均可见绿色荧光标记的 MCP-1, 但 Myriocin 组 MCP-1 表达水平低于对照组(图 2)。实时荧光定量 PCR 显示, 与对照组相比, Myriocin 组小鼠 IL-1 β mRNA ($P = 0.005$)、TNF- α mRNA ($P = 0.000$)、ICAM-1 mRNA ($P = 0.013$)、VCAM-1 mRNA ($P = 0.001$) 和 VEGF mRNA ($P = 0.037$) 表达水平均降低, IL-10 mRNA 表达水平升高($P = 0.017$), 而 IL-6 mRNA 组间差异无统计学意义($P > 0.05$), 表明 Myriocin 可下调炎症因子 mRNA 的表达, 上调抗炎性因子 mRNA 的表达(表 6)。提示 Myriocin 可有效抑制血管组织炎症反应。

Myriocin 组小鼠整合应激反应相关分子 PERK mRNA ($P = 0.004$)、eIF2 α mRNA ($P = 0.007$)、ATF4 mRNA ($P = 0.012$)、ATF6 mRNA ($P = 0.001$) 和 Caspase12 mRNA ($P = 0.000$) 表达水平降低, 而 GRP78 mRNA 和 CHOP mRNA 组间差异无统计学意义(均 $P > 0.05$, 表 7)。Western blotting 法显示, 与对照组相比, Myriocin 组小鼠 eIF2 α ($P = 0.047$)、ATF4

($P = 0.011$) 和磷酸化 p65 NF- κ B/总 p65 NF- κ B 比值($P = 0.011$) 下降, 而磷酸化 IRE1 α /总 IRE1 α 比值和活化型 Caspase12/总 Caspase12 比值组间差异未达到统计学意义(均 $P > 0.05$; 表 8, 图 3 ~ 7)。表明 Myriocin 可以抑制由 PERK/eIF2 α /ATF4 信号转导通路介导的整合应激反应。

讨 论

Myriocin 源自一种传统真菌类中药——冬虫夏草, 其作为丝氨酸棕榈酰转移酶抑制剂, 可抑制鞘脂合成, 从而延缓动脉粥样硬化进展^[6-8]。内质网应激反应是整合应激反应的中心环节, 在动脉粥样硬化的发生发展过程中发挥重要作用^[4]。本课题组的前期研究证实 Myriocin 可延缓动脉粥样硬化进展^[6], 本研究进一步探讨 Myriocin 作用机制是否与抑制整合应激反应有关。关于 Myriocin 的剂量, 文献报道其常用剂量为 0.30 mg/(kg·d)^[7-14]。

Park 等^[10]探讨不同剂量 Myriocin [0.10、0.30 和 1 mg/(kg·d)] 对 ApoE^{-/-} 小鼠血清脂质水平和动脉粥样硬化进展的影响, 其结果显示, Myriocin 治疗 12 周后 0.30 mg/(kg·d) 组小鼠动脉粥样硬化面积减少 93%。本研究以 Park 等^[10]的方案为依据, 同样采取 Myriocin 0.30 mg/(kg·d) 对 ApoE^{-/-} 小鼠灌胃治疗。

本研究经 Myriocin 灌胃治疗 12 周后, 小鼠血清 LDL-C 水平较对照组降低。已知 Myriocin 药理作用为抑制鞘脂合成, 后者是脂蛋白颗粒的组成成分, 因此可部分解释 Myriocin 组小鼠血清 LDL-C 水平降低的现象。通过对主动脉粥样部进行连续切片, 定量分析斑块面积和脂质坏死核面积, 结果显示, 两组小鼠主动脉粥样均发生动脉粥样硬化, 但 Myriocin 组斑块面积和脂质坏死核面积小于对照组, 表明 Myriocin 可有效减小斑块和脂质坏死核面积, 发挥稳定斑块的作用。

外周血单核细胞在趋化因子的作用下, 被募集进入动脉内膜。Raghavan 等^[15]研究显示, 与 Ly-6c^{low} 表型相比, Ly-6c^{high} 表型单核细胞更易形成泡沫细胞。Ly-6c^{high} 表型单核细胞亚群为经典炎症细胞, 可释放炎症因子, 如 IL-1、IL-6、TNF- α 和 MCP-1, 导致血管功能障碍和泡沫细胞聚集^[16]。本研究流式细胞术分析显示, 经 Myriocin 灌胃 8 周后, 与对照组相比, Myriocin 组小鼠 Ly-6c^{high} 亚群单核细胞比例下降

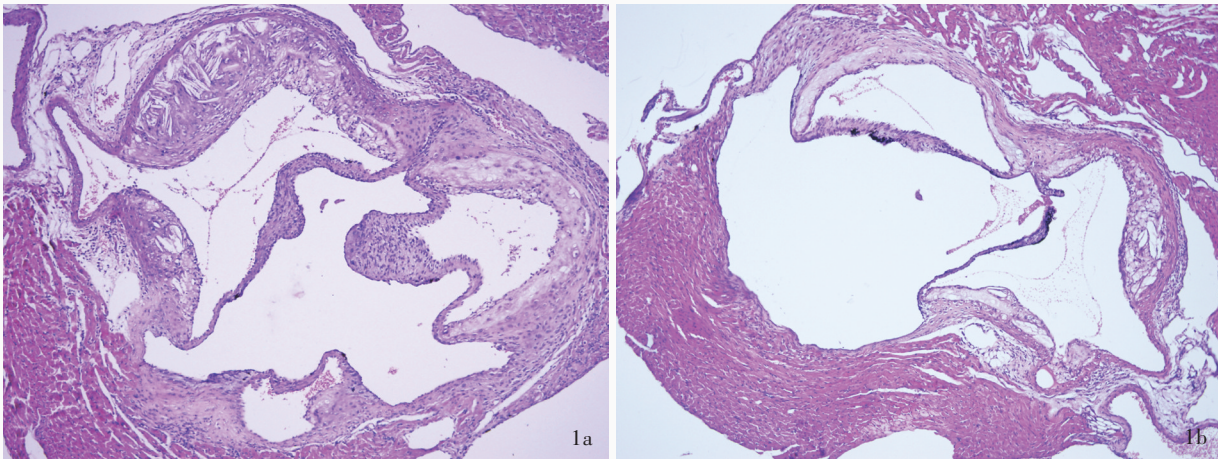


图 1 光学显微镜观察所见 HE 染色 ×100 1a 对照组小鼠存在主动脉窦斑块 1b Myriocin 组小鼠主动脉窦斑块面积小于对照组

Figure 1 Optical microscopy findings HE staining ×100 Control group mice had atherosclerotic lesions in their aortic sinus (Panel 1a). The lesions were smaller in Myriocin group (Panel 1b).

表 4 Myriocin 组与对照组小鼠主动脉窦斑块相对面积的比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

Table 4. Comparison of the percentage of plaque area between Myriocin group and control group ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	例数	主动脉瓣	距主动脉瓣 100 μm	距主动脉瓣 200 μm	距主动脉瓣 300 μm
对照组	9	33.87 ± 6.38	37.30 ± 6.57	38.02 ± 5.06	35.38 ± 7.00
Myriocin 组	9	33.88 ± 10.66	33.34 ± 8.08	27.60 ± 12.74	23.79 ± 7.03
t 值		-0.002	1.141	2.281	3.506
P 值		0.998	0.271	0.045	0.003

表 5 Myriocin 组与对照组小鼠主动脉窦脂质坏死核相对面积的比较 [$M(P_{25}, P_{75}), \%$]

Table 5. Comparison of the percentage of necrotic core area between Myriocin group and control group [$M(P_{25}, P_{75}), \%$]

组别	例数	脂质坏死核相对面积	Z 值	P 值
对照组	9	31.91(23.89, 42.47)	-2.870	0.011
Myriocin 组	9	11.39(5.58, 20.85)		

约 19.39%，表明 Myriocin 可有效抑制外周血 Ly-6c^{high} 表型单核细胞，进而减少泡沫细胞的形成。

已知炎症与动脉粥样硬化过程中的泡沫细胞形成和斑块不稳定密切相关。本研究免疫荧光染色观察两组小鼠主动脉窦斑块内均可见绿色荧光标记的 MCP-1，但 Myriocin 组 MCP-1 水平低于对照组；实时荧光定量 PCR 显示，Myriocin 组小鼠炎症因子 IL-1β mRNA、TNF-α mRNA、ICAM-1 mRNA、VCAM-1 和 VEGF mRNA 低于对照组，抗炎性因子 IL-10 mRNA 水平高于对照组，表明 Myriocin 具有抑制血管组织炎症反应的作用。

内质网应激反应可上调分子伴侣 GRP78 的表达，促使 GRP78 与 PERK、IRE1α 和 ATF6 解离，启动未折叠蛋白反应^[17]；活化的 PERK 可使下游底物 eIF2α 磷酸化，抑制蛋白质合成，同时上调 ATF4 的表达^[18]；长期过度应激反应可上调 CHOP 的表达，导致细胞凋亡，进而促进动脉粥样硬化进展^[19]。既往研究显示，动脉粥样硬化发展至晚期，凋亡的巨

噬细胞不能及时有效清除，继发坏死，进一步加重炎症反应和斑块进展^[20]。细胞器应激反应相关信号转导通路与炎症信号转导通路之间存在交叉作用^[21-22]。一方面，氧化修饰低密度脂蛋白(ox-LDL)可引起内质网应激反应，促进炎症反应，抑制血管内皮细胞脂质流出，导致血管内皮损伤^[23]；另一方面，巨噬细胞线粒体应激反应可促进炎症反应，加重动脉粥样硬化进展^[24]。研究显示，PERK 激活 eIF2α，既可以全面下调蛋白质合成、上调 ATF4 表达、促进细胞凋亡，同时还具有促进 NF-κB 活化的作用^[4, 21]。NF-κB 信号通路在炎症反应中发挥关键作用。本研究检测整合应激反应相关分子 mRNA 和蛋白水平，结果显示，Myriocin 组小鼠 PERK mRNA、eIF2α mRNA、ATF4 mRNA、ATF6 mRNA 和 Caspase12 mRNA，以及 eIF2α、ATF4 和磷酸化 p65 NF-κB/总 p65 NF-κB 比值均低于对照组，表明 Myriocin 可以抑制 PERK/eIF2α/ATF4 通路介导的整合应激反应，以及 NF-κB 信号转导通路介导的炎症

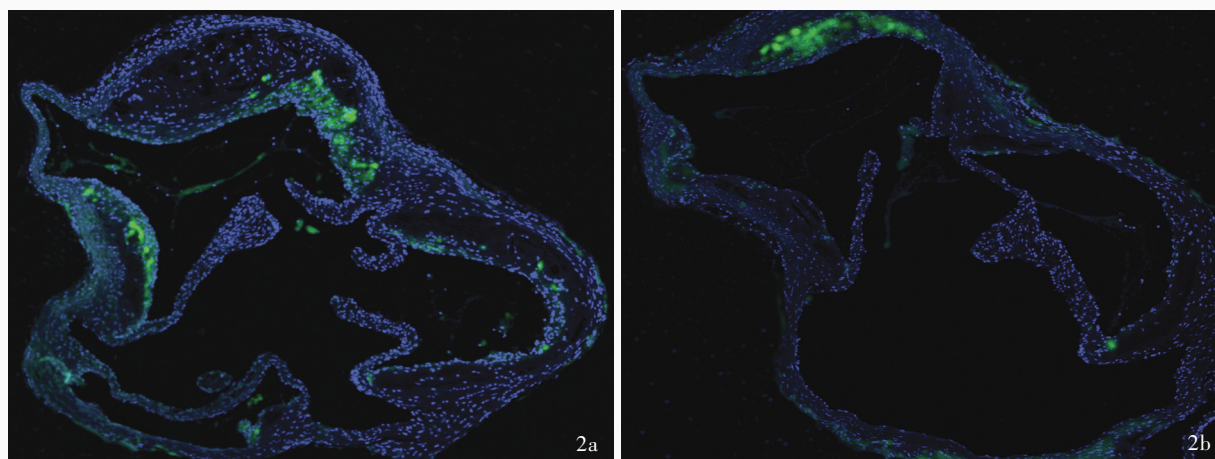


图 2 荧光共聚焦显微镜观察所见 免疫荧光染色 ×100 2a 对照组小鼠主动脉粥样斑块内可见 MCP-1 蛋白表达(绿色荧光所示) 2b Myriocin 组小鼠主动脉粥样斑块内 MCP-1 蛋白表达量低于对照组(绿色荧光所示)

Figure 2 Fluorescence confocal microscopy findings Immunofluorescence staining ×100 MCP-1 was observed in the atherosclerotic lesions of control group (green color indicates, Panel 2a). The expression of MCP-1 was decreased in the atherosclerotic lesions of Myriocin group (green color indicates, Panel 2b).

表 6 Myriocin 组与对照组小鼠炎症反应相关分子 mRNA 相对表达量的比较

Table 6. Comparison of the mRNA expression levels of inflammation related molecules between Myriocin group and control group

组别	例数*	IL-1β mRNA ($\bar{x} \pm s$)	IL-6 mRNA [$M(P_{25}, P_{75})$]	TNF-α mRNA ($\bar{x} \pm s$)	ICAM-1 mRNA ($\bar{x} \pm s$)	VCAM-1 mRNA ($\bar{x} \pm s$)	VEGF mRNA ($\bar{x} \pm s$)	IL-10 mRNA ($\bar{x} \pm s$)
对照组	8	1.00 ± 0.00	1.00(1.00, 1.00)	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
Myriocin 组	8	0.61 ± 0.28	0.78(0.20, 1.03)	0.59 ± 0.15	0.74 ± 0.23	0.58 ± 0.22	0.66 ± 0.37	2.47 ± 1.32
t 或 Z 值		3.968	16.000	7.696	3.294	5.449	2.574	-3.132
P 值		0.005	0.073	0.073	0.013	0.013	0.037	0.017

*One mouse from each group was randomly selected for aorta ORO staining, other 8 mice from each group were detected the mRNA expression levels of inflammation related molecules, 每组随机选择 1 只小鼠行主动脉油红 O 染色, 其余 8 只小鼠行炎症反应相关分子 mRNA 相对表达量的测定。IL-1β, interleukin-1β, 白细胞介素-1β; IL-6, interleukin-6, 白细胞介素-6; TNF-α, tumor necrosis factor-α, 肿瘤坏死因子-α; ICAM-1, intercellular adhesion molecule-1, 细胞间黏附分子-1; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule-1, 血管细胞黏附分子-1; VEGF, vascular endothelial growth factor, 血管内皮生长因子; IL-10, interleukin-10, 白细胞介素-10

表 7 Myriocin 组与对照组小鼠整合应激反应相关分子 mRNA 相对表达量的比较

Table 7. Comparison of the mRNA expression levels of integrated stress response related molecules between Myriocin group and control group

组别	例数*	GRP78 mRNA [$M(P_{25}, P_{75})$]	PERK mRNA ($\bar{x} \pm s$)	eIF2α mRNA [$M(P_{25}, P_{75})$]	ATF4 mRNA ($\bar{x} \pm s$)	ATF6 mRNA ($\bar{x} \pm s$)	CHOP mRNA ($\bar{x} \pm s$)	Caspase12 mRNA ($\bar{x} \pm s$)
对照组	8	1.00(1.00, 1.00)	1.00 ± 0.00	1.00(1.00, 1.00)	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
Myriocin 组	8	0.53(0.40, 1.77)	0.61 ± 0.27	0.52(0.28, 0.66)	0.69 ± 0.27	0.60 ± 0.19	0.85 ± 0.32	0.49 ± 0.20
Z 或 t 值		24.000	4.174	-2.692	3.342	5.841	1.280	7.270
P 值		0.369	0.004	0.007	0.012	0.001	0.241	0.000

*One mouse from each group was randomly selected for aorta ORO staining, other 8 mice from each group were detected the mRNA expression levels of integrated stress response related molecules, 每组随机选择 1 只小鼠行主动脉油红 O 染色, 其余 8 只小鼠行整合应激反应相关分子 mRNA 相对表达量的测定。GRP78, glucose regulated protein 78, 葡萄糖调节蛋白 78; PERK, protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase, 蛋白激酶 R 样内质网激酶; eIF2α, eukaryotic translation initiation factor 2α, 真核翻译起始因子 2α; ATF4, activating transcription factor 4, 活化转录激活因子 4; ATF6, activating transcription factor 6, 活化转录激活因子 6; CHOP, endoplasmic reticulum stress-related apoptosis protein C/EBP homologous protein, 内质网应激相关促凋亡蛋白 C/EBP 同源蛋白

反应。

综上所述, 我们认为 Myriocin 延缓 *ApoE*^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化进展涉及以下机制: (1) 调节脂质代谢。(2) 抑制血管组织脂质摄取分子的表达, 如

CD36、凝集素样氧化低密度脂蛋白受体-1(LOX-1) 和清道夫受体 A 型(SR-A)^[6]。(3) 抑制炎症反应。(4) 抑制整合应激反应。Myriocin 除了抑制动脉粥样硬化进展外, 还可改善胰岛素抵抗、稳定糖代谢、

表 8 Myriocin 组与对照组小鼠整合应激反应相关蛋白相对表达量的比较

Table 8. Comparison of the protein expression levels of markers for integrated stress response between Myriocin group and control group

组别	例数*	eIF2α($\bar{x} \pm s$)	ATF4($\bar{x} \pm s$)	磷酸化 IRE1α/总 IRE1α [$M(P_{25}, P_{75})$]	磷酸化 p65 NF-κB/ 总 p65 NF-κB($\bar{x} \pm s$)	活化型 Caspase12/总 Caspase12 [$M(P_{25}, P_{75})$]
对照组	8	1.38 ± 0.27	1.00 ± 0.32	0.87(0.52, 1.22)	0.90 ± 0.17	0.68(0.35, 0.89)
Myriocin 组	8	1.07 ± 0.30	0.58 ± 0.24	0.75(0.41, 1.10)	0.67 ± 0.13	0.40(0.17, 0.62)
t 或 Z 值		2.175	2.923	-0.735	2.909	-1.682
P 值		0.047	0.011	0.462	0.011	0.093

*One mouse from each group was randomly selected for aorta ORO staining, other 8 mice from each group were detected the protein expression levels of markers for integrated stress response, 每组随机选择 1 只小鼠行主动脉油红 O 染色, 其余 8 只小鼠行整合应激反应相关蛋白相对表达量的测定。eIF2α, eukaryotic translation initiation factor 2α, 真核翻译起始因子 2α; ATF4, activating transcription factor 4, 活化转录激活因子 4; IRE1α, inositol-requiring enzyme 1α, 肌醇依赖酶 1α; p65 NF-κB, p65 nuclear factor-κB, p65 核因子-κB

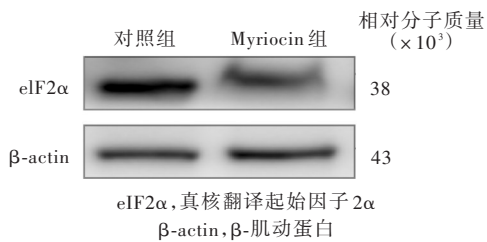


图 3 Western blotting 检测显示, Myriocin 组小鼠 eIF2α 表达水平低于对照组

Figure 3 Western blotting showed compared with control group, Myriocin reduced the expression of eIF2α.

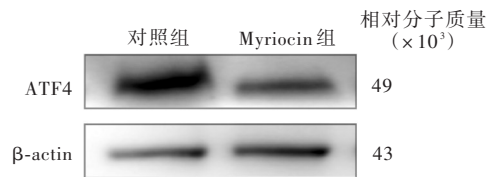


图 4 Western blotting 检测显示, Myriocin 组小鼠 ATF4 表达水平低于对照组

Figure 4 Western blotting showed compared with control group, Myriocin reduced the expression of ATF4.

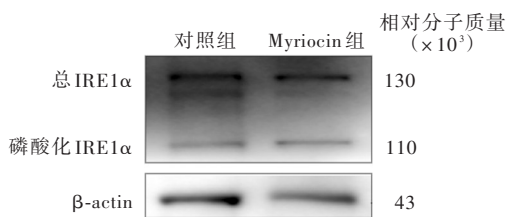


图 5 Western blotting 检测显示, Myriocin 组小鼠 IRE1α 磷酸化水平与对照组相比无显著降低

Figure 5 Western blotting showed the expression of phosphorylation of IRE1α was not significantly changed.

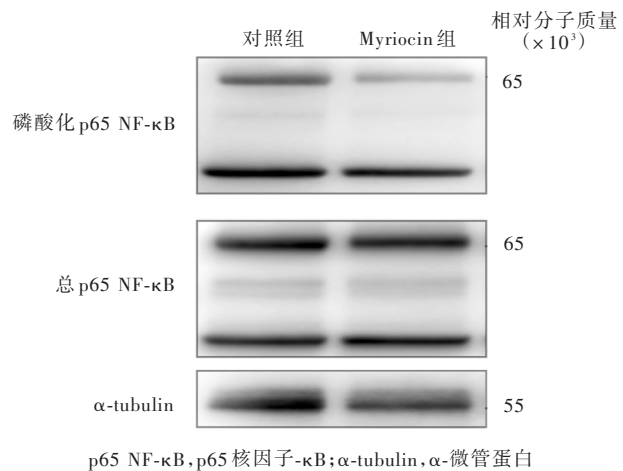


图 6 Western blotting 检测显示, Myriocin 组小鼠磷酸化 p65 NF-κB 表达水平低于对照组

Figure 6 Western blotting showed compared with control group, Myriocin reduced the expression of p65 NF-κB.

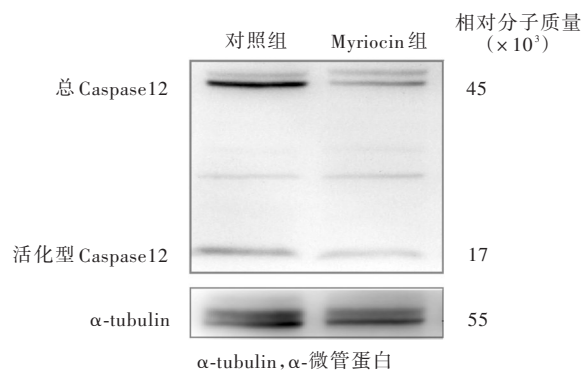


图 7 Western blotting 检测显示, Myriocin 组小鼠活化 Caspase12 表达水平与对照组相比无显著降低

Figure 7 Western blotting showed the expression of phosphorylation of cleaved Caspase12 was not significantly changed.

缓解肝脂肪变性^[25-26]。因此我们认为,经对 Myriocin 全面系统的药物安全性评价,该药物在预防与治疗动脉粥样硬化性血管病方面将有一定的临床应用前景,可与调脂药联合应用,尤其适用于对调脂药不敏感或无法耐受的患者。本研究仅为动物实验,无细胞实验的支持;而且未设置药物浓度梯度、未监测血药浓度,所检测的指标亦不够全面。进一步研究将在设立药物浓度梯度的基础上,进行细胞水平验证。

利益冲突 无

参 考 文 献

- [1] Onat UI, Yildirim AD, Tufanli O, Cimen I, Kocaturk B, Veli Z, Hamid SM, Shimada K, Chen S, Sin J, Shah PK, Gottlieb RA, Arditi M, Erbay E. Intercepting the lipid-induced integrated stress response reduces atherosclerosis [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2019, 73:1149-1169.
- [2] Pakos-Zebrucka K, Koryga I, Mnich K, Ljujic M, Samali A, Gorman AM. The integrated stress response [J]. *EMBO Rep*, 2016, 17:1374-1395.
- [3] Hotamisligil GS, Erbay E. Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases [J]. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8:923-934.
- [4] Zhou AX, Tabas I. The UPR in atherosclerosis [J]. *Semin Immunopathol*, 2013, 35:321-332.
- [5] Fuster JJ. Integrated stress response inhibition in atherosclerosis: preventing the stressed-out plaque [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2019, 73:1170-1172.
- [6] Yu Z, Peng Q, Li S, Hao H, Deng J, Meng L, Shen Z, Yu W, Nan D, Bai Y, Huang Y. Myriocin and d-PDMP ameliorate atherosclerosis in *ApoE*^{-/-} mice via reducing lipid uptake and vascular inflammation [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2020, 134:439-458.
- [7] Park TS, Panek RL, Mueller SB, Hanselman JC, Rosebury WS, Robertson AW, Kindt EK, Homan R, Karathanasis SK, Rekhter MD. Inhibition of sphingomyelin synthesis reduces atherogenesis in apolipoprotein E - knockout mice [J]. *Circulation*, 2004, 110:3465-3471.
- [8] Glaros EN, Kim WS, Quinn CM, Jessup W, Rye KA, Garner B. Myriocin slows the progression of established atherosclerotic lesions in apolipoprotein E gene knockout mice [J]. *J Lipid Res*, 2008, 49:324-331.
- [9] Hojjati MR, Li Z, Zhou H, Tang S, Huan C, Ooi E, Lu S, Jiang XC. Effect of myriocin on plasma sphingolipid metabolism and atherosclerosis in *ApoE*-deficient mice [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280:10284-10289.
- [10] Park TS, Panek RL, Rekhter MD, Mueller SB, Rosebury WS, Robertson A, Hanselman JC, Kindt E, Homan R, Karathanasis SK. Modulation of lipoprotein metabolism by inhibition of sphingomyelin synthesis in *ApoE* knockout mice [J]. *Atherosclerosis*, 2006, 189:264-272.
- [11] Glaros EN, Kim WS, Wu BJ, Suarna C, Quinn CM, Rye KA, Stocker R, Jessup W, Garner B. Inhibition of atherosclerosis by the serine palmitoyl transferase inhibitor myriocin is associated with reduced plasma glycosphingolipid concentration [J]. *Biochem Pharmacol*, 2007, 73:1340-1346.
- [12] Park TS, Rosebury W, Kindt EK, Kowala MC, Panek RL. Serine palmitoyltransferase inhibitor myriocin induces the regression of atherosclerotic plaques in hyperlipidemic *ApoE*-deficient mice [J]. *Pharmacol Res*, 2008, 58:45-51.
- [13] Dekker MJ, Baker C, Naples M, Samsoundar J, Zhang R, Qiu W, Sacco J, Adeli K. Inhibition of sphingolipid synthesis improves dyslipidemia in the diet-induced hamster model of insulin resistance: evidence for the role of sphingosine and sphinganine in hepatic VLDL - ApoB100 overproduction [J]. *Atherosclerosis*, 2013, 228:98-109.
- [14] Kurek K, Piotrowska DM, Wiesiolek - Kurek P, Łukaszuk B, Chabowski A, Górski J, Zendzian-Piotrowska M. Inhibition of ceramide de novo synthesis reduces liver lipid accumulation in rats with nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Liver Int*, 2014, 34:1074-1083.
- [15] Raghavan S, Singh NK, Gali S, Mani AM, Rao GN. Protein kinase C via activating transcription factor 2-mediated CD36 expression and foam cell formation of Ly6C(hi) cells contributes to atherosclerosis [J]. *Circulation*, 2018, 138:2395-2412.
- [16] Fang P, Li X, Shan H, Saredy JJ, Cueto R, Xia J, Jiang X, Yang XF, Wang H. Ly6C(+) inflammatory monocyte differentiation partially mediates hyperhomocysteinemia-induced vascular dysfunction in type 2 diabetic db/db mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2019, 39:2097-2119.
- [17] Ghemrawi R, Battaglia - Hsu SF, Arnold C. Endoplasmic reticulum stress in metabolic disorders [J]. *Cells*, 2018, 7:63.
- [18] Bond S, Lopez-Lloreda C, Gannon PJ, Akay-Espinoza C, Jordan-Sciutto KL. The integrated stress response and phosphorylated eukaryotic initiation factor 2 α in neurodegeneration [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2020, 79:123-143.
- [19] Zhou AX, Wang X, Lin CS, Han J, Yong J, Nadolski MJ, Boren J, Kaufman RJ, Tabas I. C/EBP-homologous protein (CHOP) in vascular smooth muscle cells regulates their proliferation in aortic explants and atherosclerotic lesions [J]. *Circ Res*, 2015, 116:1736-1743.
- [20] Gonzalez L, Trigatti BL. Macrophage apoptosis and necrotic core development in atherosclerosis: a rapidly advancing field with clinical relevance to imaging and therapy [J]. *Can J Cardiol*, 2017, 33:303-312.
- [21] Di Conza G, Ho PC. ER stress responses: an emerging modulator for innate immunity [J]. *Cells*, 2020, 9:695.
- [22] Shah PK, Lecis D. Inflammation in atherosclerotic cardiovascular disease [J]. *F1000 Res*, 2019, 8:F1000.
- [23] Hang L, Peng Y, Xiang R, Li X, Li Z. Ox - LDL causes endothelial cell injury through ASK1/NLRP3 - mediated inflammasome activation via endoplasmic reticulum stress [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2020, 14:731-744.
- [24] Wang Y, Wang GZ, Rabinovitch PS, Tabas I. Macrophage mitochondrial oxidative stress promotes atherosclerosis and nuclear factor-kappa B-mediated inflammation in macrophages [J]. *Circ Res*, 2014, 114:421-433.
- [25] Campana M, Bellini L, Rouch C, Rachdi L, Coant N, Butin N, Bandet CL, Philippe E, Meneyrol K, Kassiss N, Dairou J, Hajduch E, Colsch B, Magnan C, Le Stunff H. Inhibition of central de novo ceramide synthesis restores insulin signaling in hypothalamus and enhances beta-cell function of obese Zucker rats [J]. *Mol Metab*, 2018, 8:23-36.
- [26] Zabielski P, Daniluk J, Hady HR, Markowski AR, Imierska M, Górski J, Blachnio-Zabielska AU. The effect of high-fat diet and inhibition of ceramide production on insulin action in liver [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234:1851-1861.

(收稿日期:2020-09-29)

(本文编辑:彭一帆)