

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.01.016

miRNA-383 对急性胰腺炎腺泡细胞自噬的影响作用*

郑绍越 黄永明 杨正鹏 苗 壮 薛东波[△]

(哈尔滨医科大学附属第一医院普外科 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 目的:检测转染 miRNA-383 的急性胰腺炎细胞模型中自噬标志蛋白 LC3 及 Beclin1 的表达情况,研究 miRNA-383 对急性胰腺炎腺泡细胞自噬功能的影响作用。**方法:**在前期工作中利用生物信息技术筛选出在急性胰腺炎中表达下调的 miRNA-383。培养 AR42J 细胞,转染 miRNA-383 类似物、抑制物以及阴性对照。使用牛磺胆酸钠盐以浓度 200 μ M 刺激细胞 20 min 制造急性胰腺炎细胞模型,使用 BZiPAR 检测胰酶激活程度证明此造模方法成功后,以此条件在转染完成后刺激 AR42J 细胞制造急性胰腺炎细胞模型。牛磺胆酸钠盐以浓度 200 μ M 刺激细胞 20 min 后提取细胞蛋白,利用 western blot 技术检测各组自噬标志蛋白 Beclin1 的表达情况及 LC3-II 与 LC3-I 比值的变化。**结果:**急性胰腺炎细胞模型造模成功,western blot 技术检测 miRNA-383 抑制物转染组 AR42J 细胞自噬标志蛋白 Beclin1 表达水平及 LC3-II/LC3-I 的值上调 ($P<0.05$),miRNA-383 类似物转染组细胞 Beclin1 表达水平及 LC3-II/LC3-I 的值下调($P<0.05$)。**结论:**miRNA-383 可以降低急性胰腺炎时细胞自噬水平,下调 miRNA-383 的表达可以提高急性胰腺炎时细胞自噬水平。

关键词:miRNA-383;自噬;急性胰腺炎

中图分类号:R576 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)01-66-04

MiRNA-383 Regulates the Acinar Cell Autophagy in Acute Pancreatitis*

ZHENG Shao-yue, HUANG Yong-ming, YANG Zheng-peng, MIAO Zhuang, XUE Dong-bo[△]

(Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China)

ABSTRACT Objective: To detect the expression of autophagy marker protein LC3- II and Beclin1 in the acute pancreatitis cell model and investigate the regulation effects of miRNA-383 on the acinar cell autophagy function in acute pancreatitis. **Methods:** Before the experiments the biological information analysis technology was used to screen the differently expressed miRNAs in the rat acute pancreatitis models. The down-regulated miRNA, miRNA-383 was found. After culturing AR42J cells, the miRNA-383 mimics, miRNA-383 inhibitor and negative control miRNA-383 were transfected into the cells to regulate the expression of miRNA-383 in each group. Taurocholic acid sodium salt with the concentration of 200 μ M stimulated the AR42J cells for 20 minutes to manufacture the acute pancreatitis cell models. The activation of the pancreatic enzymes in each group was detected by the BZiPAR to confirm that the acute pancreatitis cell models were fit for the experiment in this study. The acute pancreatitis cell models were manufactured with the taurocholic acid sodium salt stimulation methods after the transfection of AR42J cells. The protein in the cells would be extracted after the AR42J cells stimulated by taurocholic acid sodium salt. Then the expression degree of autophagy marker protein Beclin1 and the ratio of LC3- II to LC3- I which extracted from each group were detected by western blot technology. **Results:** The way that using the taurocholic acid sodium salt to manufacture the acute pancreatitis cell models was fit for the experiment in this study. The expression of autophagy marker protein Beclin1 and the ratio of LC3- II to LC3- I were up-regulated in the AR42J cells which were transfected with miRNA-383 inhibitor($P<0.05$); the expression of the autophagy marker protein Beclin1 and the ratio of LC3- II to LC3- I was down-regulated in the AR42J cells which were transfected with miRNA-383 mimics ($P<0.05$). **Conclusion:** MiRNA-383 decreases the cell autophagy activation in acute pancreatitis. Down-regulating the expression of miRNA-383 increases the autophagy activation in acute pancreatitis.

Key words: miRNA-383; Autophagy; Acute pancreatitis

Chinese Library Classification(CLC): R576 **Document code :** A

Article ID:1673-6273(2017)01-66-04

前言

急性胰腺炎 (acute pancreatitis, AP) 是临床上常见的急性病,是当前胰腺病研究的一个热点。目前 AP 的发病机制尚未

完全明确,但普遍认为胰酶异常激活是 AP 造成损伤的关键因素^[1,2]。临床上由于缺乏针对及有效的治疗方法,较多依靠补液、预防性应用抗生素、肠内营养等方法缓解病情,是一种难治而且病情又比较危急的疾病^[3]。自噬(autophagy)是生物在进化过

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81370566)

作者简介:郑绍越(1989-),男,硕士研究生,主要研究方向:急性胰腺炎与自噬,电话:13936185690, E-mail: zhengshaoyuehyd@163.com

[△] 通讯作者:薛东波,男,硕士生导师,教授,主要研究方向:急性胰腺炎与自噬,电话:13845103698, E-mail: xue9971@sina.com

(收稿日期:2016-04-28 接受日期:2016-05-17)

程中产生的一种保护机制,其主要功能是降解细胞内的多种蛋白以及细胞器,对抗外界刺激^[4]。目前很多研究表明自噬参与了 AP 的发生发展,调控自噬,可能会对 AP 的严重程度起到控制作用。

微小 RNA(microRNA, miRNA)是在真核生物中发现的一类具有调控靶基因表达的非编码 RNA,对疾病的发生发展起到调控作用。近年来随着研究的深入,发现一些 miRNA 可以在 AP 模型中调节靶基因的表达,干预 AP 病程^[5]。本研究在前期准备阶段采用了生物信息分析技术,筛选出了在 AP 中下调表达的 miRNA-383。对 miRNA-383 进行功能分析,发现 miRNA-383 下调表达可以激活 JAK-STAT 信号通路,而 JAK-STAT 信号通路参与了 AP 的病理变化^[6]。设计实验向 AP 模型腺泡细胞转染 miRNA-383,通过检测自噬标志蛋白 LC3 及 Beclin1^[7,8],观察 miRNA-383 是否会对 AP 中的腺泡细胞自噬产生影响。

1 材料与方法

1.1 主要材料及试剂

大鼠胰腺 AR42J 细胞购自美国 ATCC 公司;1640 培养基、PBS 购自美国 Hyclone 公司;胎牛血清购自德国 PAN-Biotech 公司;牛磺胆酸钠盐(TLCs)购自美国 Sigma 公司;兔抗大鼠 LC3 抗体、Beclin1 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司;Rhodamine 110, bis-(CBZ-L-isoleucyl-L-prolyl-L-arginine amide)dihydrochloride (BZiPAR)购自美国 Gibco 公司;miRNA 类似物 micrON™ mo-miR-383 mimics (序列:CAGAUCAGAAGGUGACUGUGG),miRNA 抑制物 micrOFF™ mo-miR-383 inhibitor,阴性对照 negative control miRNA mimics-383(NC miRNA-383), negative control miRNA-383 inhibitor (NC miRNA-383 inhibitor)均由广州锐博生物公司设计合成。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 AR42J 细胞的培养 AR42J 细胞以 2×10^5 细胞数接种于 25 cm^2 培养瓶中,加入含 15%胎牛血清的 1640 培养基约 4 mL,于 37°C 、 CO_2 含量 5%、饱和湿度恒温箱培养 2 d,显微镜下观察细胞处于对数期,活性良好。

1.2.2 急性胰腺炎细胞模型的建立 通过查询文献,发现建立 AR42J 细胞 AP 模型的方法为使用 TLCs 以 $200 \mu\text{M}$ 浓度刺激 AR42J 细胞 20 min^[9],在此条件下建立的 AP 细胞模型胰腺炎程度最强,AP 的表现最明显。首先依此条件试验制造 AP 细胞模型,使用 BZiPAR 检测胰酶激活程度,观察发现胰酶激活明显增多,AP 表现明显,此模型建立方法可用。同时利用 western blot 技术检测此模型细胞自噬标志蛋白 Beclin1 与正常细胞 Beclin1 的表达,评估自噬的改变。

1.2.3 转染 miRNA-383 将处于对数期的细胞以每孔 2×10^5 的细胞数接种于 6 孔板中。

细胞种板后即可转染 miRNA,按照使用说明,配置 miRNA-383 转染试剂,加入 6 孔板中转染 AR42J 细胞,转染 48 h 后,更换培养基,AP 造模组需加入 TLCs 浓度为 $200 \mu\text{M}$ 的培养基刺激 20 min,非造模组加入正常培养基 2 mL 培养 20 min。细胞接种于 6 孔板后,分 6 组进行实验,各组分组以及处理方法如下:空白组(control group),加入正常培养基 2 mL 培养

48 h;NC miRNA-383 inhibitor 转染组(NC miRNA-383 inhibitor group),加入 NC miRNA-383 inhibitor 浓度为 50 nM 的培养基 2 mL 转染 48 h;miRNA-383 inhibitor 转染组(miRNA-383 inhibitor group),加入 miRNA-383 inhibitor 浓度为 50 nM 的培养基 2 mL 转染 48 h;TLCs 刺激造模组(TLCs group),加入正常培养基 2 mL 培养 48 h 后弃去培养基加入 TLCs 浓度为 $200 \mu\text{M}$ 的培养基 2 mL 刺激 20 min;NC miRNA-383 mimics 转染后 TLCs 刺激造模组(NC miRNA-383 mimics + TLCs group),加入 NC miRNA-383 mimics 浓度为 50 nM 的培养基 2 mL 转染 48 h 后弃去培养基,加入 TLCs 浓度为 $200 \mu\text{M}$ 的培养基 2 mL 刺激 20 min;miRNA-383 mimics 转染后 TLCs 刺激造模组(miRNA-383 mimics + TLCs group),加入 miRNA-383 mimics 浓度为 50 nM 的培养基 2 mL 转染 48 h 后弃去培养基,加入 TLCs 浓度为 $200 \mu\text{M}$ 的培养基 2 mL 刺激 20 min。

1.2.4 Western blot 检测自噬标志蛋白 LC3,Beclin1 提取 6 组细胞的蛋白质,BCA 法测各组蛋白质浓度,各取每组相同质量的蛋白,上样于电泳凝胶上,进行电泳。电泳完成后在冰盒内恒流电转将蛋白转至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,用 5%脱脂奶粉封闭 1 h 后,将兔抗大鼠 LC3,Beclin1 一抗按 1:1000 比例与脱脂牛奶混合稀释,加入到一抗孵育盒中对应的蛋白条带格子内,每格 4 mL 一抗牛奶混合液孵育, 4°C 过夜。一抗孵育完成后先用 PBS 洗膜,然后用二抗室温孵育 1 h。完成后洗膜,即可利用发光剂进行显影等处理。处理完成后观察 Beclin1 蛋白的表达量及 LC3-I 向 LC3-II 的转化。

1.2.5 统计学分析 所有数据均采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS13.0 软件处理进行统计学分析,两组间均数比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 AP 模型的观察

使用 TLCs 以 $200 \mu\text{M}$ 浓度刺激 AR42J 细胞 20 min,加入 BZiPAR 检测胰酶激活程度,于共聚焦显微镜下观察,与正常 AR42J 细胞比较,发现胰酶激活明显增多(图 1),依此刺激条件建立 AP 细胞模型成功。同时使用 western blot 方法检测 Beclin1 的差异表达,结果 TLCs 处理的细胞 Beclin1 表达明显高于正常细胞(图 2),自噬明显增强。

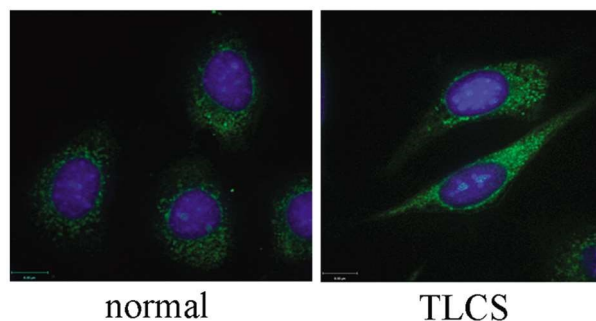


图 1 正常及 TLCs 处理的 AR42J 细胞的胰酶激活。

Fig.1 The pancreatic enzyme activation of normal AR42J cells and the ones stimulated by TLCs

Note: The green fluorescent is the activated pancreatic enzyme. The blue oval is the nucleus. ($\times 800$, scale bar $8 \mu\text{m}$)

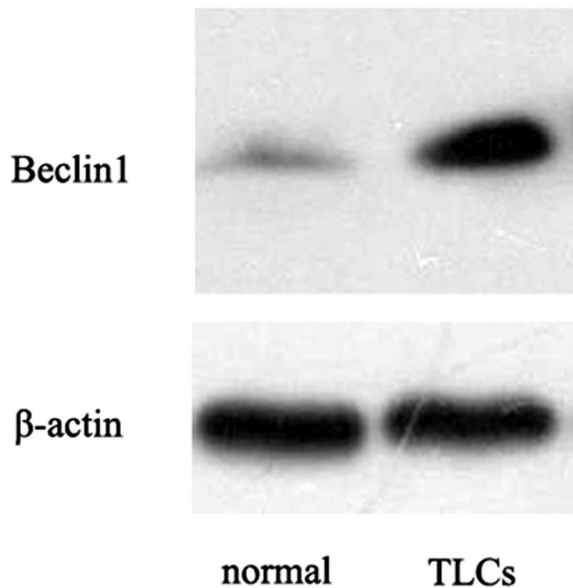


图2 正常及 TLCs 处理的 AR42J 细胞的 Beclin1 表达量

Fig. 2 The Beclin1 expression of the AR42J cells stimulated by TLCs and the normal ones

2.2 miRNA-383 对自噬的影响

6 组细胞各组使用 western blot 技术检测自噬标志蛋白 LC3 及 Beclin1, 观察 Beclin1 表达量的变化及 LC3- I 向 LC3- II 的转化。结果空白组以及 NC miRNA-383 inhibitor 组的 Beclin1 表达水平都低于 miRNA-383 inhibitor 组的表达水平, 同时 miRNA-383 inhibitor 组 LC3- I 向 LC3- II 的转化明显增强, LC3- II 表达量明显增多, 说明 miRNA-383 inhibitor 成功转染进 AR42J 细胞, 降低了 miRNA-383 的表达水平, 促使 AR42J 细胞自噬增强; TLCs 组以及 NC miRNA-383 mimics + TLCs 组的 Beclin1 表达水平都高于 miRNA-383 mimics + TLCs 组的表达水平, 同时 miRNA-383 mimics+TLCs 组 LC3- I 向 LC3- II 的转化明显减弱, LC3- II 表达量明显减少, 说明 miRNA-383 mimics 成功转染进 AR42J 细胞, 提高了 miRNA-383 的表达水平, 降低了 AR42J 细胞的自噬水平 ($P < 0.05$, 如图 3, 图 4)。

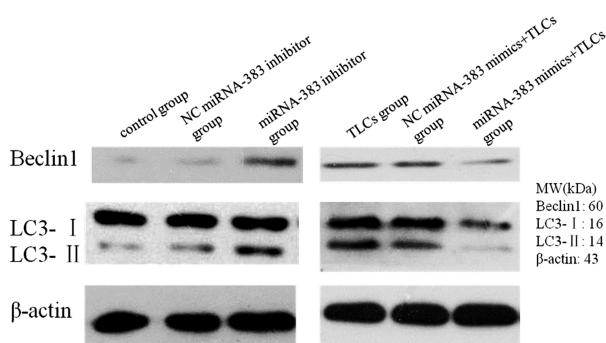


图3 各组自噬标志蛋白 LC3 及 Beclin1 的变化。

Fig. 3 The expression of the autophagy marker protein LC3 and Beclin1 from each group

3 讨论

自噬是细胞重要的生理过程, 参与了许多疾病的发生发展。在研究动物 AP 模型的早期阶段, 在电镜下观察 AP 模型胰

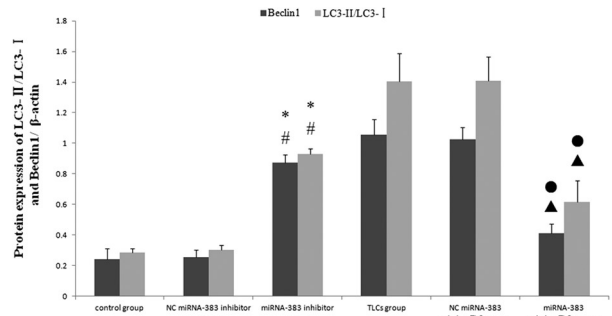


图4 各组自噬标志蛋白 LC3-II/LC3-I 及 Beclin1 测得的表达量

Fig.4 The gray value of the autophagy marker protein LC3-II/LC3-I and Beclin1 from each group

Note: *: $P < 0.05$, compared with control group; #: $P < 0.05$, compared with NC miRNA-383 inhibitor group; •: $P < 0.05$, compared with TLCs group; ▲: $P < 0.05$, compared with NC miRNA-383 mimics + TLCs group.

腺组织发现胰腺细胞胞浆内出现许多空泡, 而且空泡内发现酶原颗粒^[10], 在后来的研究中 Hashimoto D 等^[11]人证实这些空泡内含有自噬标志蛋白 LC3, 认为这些空泡即为自噬体。自噬是 AP 中重要的生理病理变化, 对 AP 的发生发展起着非常重要的调控作用。研究表明在 AP 病程中, 自噬功能发生障碍, 造成其他细胞器或细胞蛋白的功能变化, 最终引起细胞死亡, 加重 AP 炎症程度^[12,13]。近年来有研究发现一种在 AP 中发挥细胞保护作用的选择性自噬, 这种自噬在 AP 时选择性吞噬酶原颗粒, 消化酶原颗粒防止过量的酶原激活, 减轻胰酶造成的损伤, 进而保护胰腺细胞, 防止胰腺细胞大量死亡^[14]。但在另一方面, Feng 等^[15]人研究的 IL-22 重组腺病毒注入 AP 小鼠抑制自噬却减轻了炎症程度, Yang 等^[16]阻断 NF- κ B 通路发现自噬受抑制的同时减轻了 AP 的程度, 这些研究认为自噬在 AP 中促进胰酶激活, 对胰腺组织起到破坏作用。近年来自噬在 AP 中这种复杂的影响作用及探索确切的自噬分子机制逐渐成为研究热点。

在自噬的过程中一系列的自噬相关蛋白参与了自噬过程的发生发展, 在自噬体形成的不同阶段发挥作用。LC3 是哺乳动物酵母 ATG8 基因的同源基因, 定位于自噬体表面。LC3 在细胞内以两种形式存在, 为 LC3- I 及 LC3- II。LC3 蛋白在细胞内合成后即被相关蛋白酶切割成为 LC3- I, 散在于细胞浆内。当发生自噬时, LC3- I 与磷脂酰乙醇胺偶联形成 LC3- II, 并定位于自噬体膜上。与其他的一些定位于自噬体膜上的自噬相关蛋白不同, LC3- II 蛋白始终定位于自噬体膜上, 直到自噬体与溶酶体结合 LC3- II 蛋白才被消化掉, 因此常被用来作为自噬体的标志物, 而且 LC3- II 的数量也在一定程度上反应了自噬体的数量以及自噬强度的变化^[17]。通过 Western blot 技术检测自噬发生时的 LC3 蛋白, 检测到两个条带的蛋白质, 分别为 LC3- I 及 LC3- II。在自噬时总的 LC3 蛋白水平上调其实不大, 主要发生的是 LC3- I 向 LC3- II 转化, 计算 LC3- II/LC3- I 的值可以一定程度上反应自噬水平的变化^[18]。Beclin1 是酵母 ATG6 的同系物, 哺乳动物的自噬相关基因, 主要与 III 型 PI3K (phosphatidylinositol 3, kinase) 形成复合体, 募集结合其他自噬相关蛋白, 形成蛋白复合体, 促进自噬体的形成^[19]。Beclin1 是细胞自噬的一个关键调控因子, 是自噬体形成的不可或缺的条件。

件,在癌症方面的研究,Beclin1 已经成为促进自噬的抑癌基因的研究热点。LC3 和 Beclin1 这两种蛋白,是自噬研究中应用最普遍的自噬标志蛋白,同时在急性胰腺炎的自噬研究中,作为自噬强度的重要测量指标^[7]。

生物信息学(Bioinformatics)是研究生物信息的采集、处理、存储、传播,分析和解释等各方面的学科,也是随着生命科学和计算机科学的高速迅猛发展,生命科学和计算机科学相结合形成的一门新兴学科。生物信息分析技术是新兴学科和研究技术,不仅能说明基因调节网络的局部特征,还能对调控信号通路进行全面系统的分析,现已成为一种重要的研究疾病的方法^[20]。我们在实验的前期阶段,利用生物信息技术,经过信息整合和筛选,利用模块化分析,提取 miRNA 芯片,比较两个样本的 microRNA 转录差异倍数,经过生物信息技术处理,最终发现 miRNA-383,并且分析结果表明 miRNA-383 在 AP 中表达下降。自噬是 AP 中重要的生理病理学变化,与其他的各种 AP 的病理变化有着关联,为探究 miRNA-383 与自噬可能存在的关系,向细胞内转染 miRNA-383 并构建了 AP 细胞模型。转染 miRNA-383 mimics 提高 miRNA-383 水平对抗 miRNA-383 表达下调,从 TLCs 刺激造模的各组的对照结果中,发现提高 miRNA-383 的水平,被 TLCs 刺激而处于高自噬强度的 AR42J 细胞的 Beclin1 的表达水平发生下调,Beclin1 对自噬的促进作用减弱,同时 LC3-I 向 LC3-II 转化降低,LC3-II/LC3-I 的比值下降,自噬体数量减少自噬功能减弱,这两种蛋白的表达量变化说明上调 miRNA-383 的表达水平可以抑制 AP 病程中 AR42J 细胞的自噬功能。另一方面,由于经过生物信息分析发现 miRNA-383 在 AP 中表达下降,为了观察到比较明显的降低 miRNA-383 水平可能对自噬产生的影响,所以向正常的 AR42J 细胞中转染 miRNA-383 inhibitor,降低 miRNA-383 水平,观察其对自噬的影响。从没有用 TLCs 刺激的各组对照结果中,发现降低 miRNA-383 的水平,正常的 AR42J 细胞的 Beclin1 表达水平上调,Beclin1 对自噬的促进作用增强,同时 LC3-II/LC3-I 的比值上升,自噬体数量增多自噬功能增强,这两种蛋白的表达量变化说明下调 miRNA-383 的表达水平可以增强了 AR42J 细胞的自噬功能。在 AP 的病程中,如果自噬功能亢进,但是不能很好的降解吞噬的胰酶,反而使更多的胰酶激活,自噬就会加重炎症程度,那么此时上调 miRNA-383 的表达抑制自噬,则可能减轻 AP 的损伤;自噬如果受到某些条件干扰,正常的吞噬降解功能未完全发挥作用,那么如果能采用一些方法进一步降低 miRNA-383 的表达水平,增强自噬功能,从而使在 AP 中被异常激活的酶原充分被自噬功能降解,则可能减轻 AP 的炎症程度。

近年来随着对自噬的研究深入,自噬过程被细化,出现了自噬潮(autophagic flux)的概念,AP 过程中自噬功能的损伤,是自噬潮中自噬囊泡堆积,溶酶体功能障碍等多因素导致的^[21]。多种因素破坏自噬潮过程,组织蛋白酶 B(cathepsin B)与组织蛋白酶 L(cathepsin L)功能失调,又导致了 AP 中胰酶激活^[22]。自噬潮受损,胰蛋白酶原的异常激活,是 AP 腺泡细胞内的早期病理改变,并且酶原激活后又会损伤细胞,加重自噬潮损伤,两者相互作用,关系复杂。在此实验中,观察到了上调及下调 miRNA-383 表达水平对自噬的影响,但是自噬潮是否发生改

变,胰酶激活对自噬过程是否产生影响,目前尚未完全阐明,所以随着关于胰酶与自噬关系的研究越来越深入,miRNA-383 调节腺泡细胞自噬的机制会更加明确。

参考文献(References)

- [1] Gaiser S, Daniluk J, Liu Y, et al. Intracellular activation of trypsinogen in transgenic mice induces acute but not chronic pancreatitis [J]. Gut, 2011, 60(10):1379-1388
- [2] Ning W, Wang Y, Zhang F, et al. Beneficial effects of trypsin inhibitors derived from a spider venom peptide in L-arginine-induced severe acute pancreatitis in mice[J]. PLoS One, 2013, 8(4): e61049
- [3] Goldenberg DE, Gordon SR, Gardner TB. Management of acute pancreatitis[J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2014, 8(6): 687-694
- [4] Sarah A Jones, Kingston HG Mills, James Harris. Autophagy and inflammatory diseases [J]. Immunology and Cell Biology, 2013, 91(3): 250-258
- [5] Qin T, Fu Q, Pan YF, et al. Expressions of miR-22 and miR-135a in acute pancreatitis[J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2014, 34(2): 225-233
- [6] Chen P, Huang L, Zhang Y, et al. The antagonist of the JAK-1/STAT-1 signaling pathway improves the severity of cerulein-stimulated pancreatic injury via inhibition of NF- κ B activity [J]. Int J Mol Med, 2011, 27(5): 731-738
- [7] Zhang L, Zhang J, Shea K, et al. Autophagy in pancreatic acinar cells in caerulein-treated mice: immunolocalization of related proteins and their potential as markers of pancreatitis [J]. Toxicol Pathol, 2014, 42(2): 435-457
- [8] Huang R, Liu W. Identifying an essential role of nuclear LC3 for autophagy[J]. Autophagy, 2015, 11(5): 852-853
- [9] Li Z, Lu M, Chu J, et al. Early proteome analysis of rat pancreatic acinar AR42J cells treated with tauro lithocholic acid 3-sulfate [J]. Pancreatology, 2012, 12(3): 248-256
- [10] Emanuelli G, Montrucchio G, Gaia E, et al. Experimental acute pancreatitis induced by platelet activating factor in rabbits [J]. Am J Pathol, 1989, 134(2): 315-326
- [11] Hashimoto D, Ohmuraya M, Hirot M, et al. Involvement of autophagy in trypsinogen activation within the pancreatic acinar cells[J]. J Cell Biol, 2008, 181(7): 1065-1072
- [12] Gukovsky I, Gukovskaya AS. Impaired autophagy underlies key pathological responses of acute pancreatitis [J]. Autophagy, 2010, 6(3): 428-429
- [13] Gukovsky I, Pandol SJ, Mareninova OA, et al. Impaired autophagy and organellar dysfunction in pancreatitis[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2012, 27 Suppl 2: 27-32
- [14] Grasso D, Ropolo A, Lo Ré A, et al. Zymophagy, a novel selective autophagy pathway mediated by VMP1-USP9x-p62, prevents pancreatic cell death[J]. J Biol Chem, 2011, 286(10): 8308-8324
- [15] Feng D, Park O, Radaeva S, et al. Interleukin-22 ameliorates cerulein-induced pancreatitis in mice by inhibiting the autophagic pathway[J]. Int J Biol Sci, 2012, 8(2): 249-257
- [16] Yang S, Bing M, Chen F, et al. Autophagy regulation by the nuclear factor κ B signal axis in acute pancreatitis [J]. Pancreas, 2012, 41(3): 367-373

- Of Ophthalmology, 2015, 160(2): 256-265
- [6] 尹加林, 戴琼艳, 谢欣怡, 等. 三种不同剂量右美托咪定对全麻鼻内镜手术围拔管期应激反应的影响 [J]. 临床麻醉学杂志, 2014, 30(10): 942-945
Yin Jia-lin, Dai Qiong-yan, Xie Xin-yi, et al. The effect of three different doses of dexmedetomidine on the stress reaction during tracheal extubation after intranasal endoscopic surgery[J]. J Clin Anesthesiol, 2014, 30(10): 942-945
- [7] Riker RR, Picard JT, Fraser GL. Prospective evaluation of the Sedation-Agitation Scale for adult critically ill patients [J]. Crit Care Med, 1999, 27(7): 1325-1329
- [8] Jiang Y, Hao Y, Zhang Y, et al. Thirty minute transcutaneous electric acupoint stimulation modulates resting state brain activities: a perfusion and BOLD fMRI study[J]. Brain Res, 2012, 1457: 13-25
- [9] Ni JW, Jiang LM, Zhou YM. Effect of Transcutaneous Acupoint Electrical Stimulation on Postoperative Cognitive Function in Elderly Patients Undergoing Laparoscopic Resection of Rectal Cancer [J]. Chinese General Practice, 2015, 18(12): 1390-1395
- [10] 黄舜, 彭文平, 田雪, 等. 不同频率经皮穴位电刺激对胸腔镜肺叶切除术中患者阿片类药物的节俭作用 [J]. 中华麻醉学杂志, 2015, 35(3): 340-343
Huang Shun, Peng Wen-ping, Tian Xue, et al. Intraoperative opioid-sparing effect of different frequency transcutaneous electrical acupoint stimulation in patients undergoing video-assisted thoracoscopic pneumonectomy [J]. Chinese Journal of Anesthesiology, 2015, 35(3): 340-343
- [11] Lv JQ, Feng RZ, Li N. P6 acupoint stimulation for prevention of postoperative nausea and vomiting in patients undergoing craniotomy: study protocol for a randomized controlled trial [J]. Trials, 2013, 14(1): 1-7
- [12] 袁军, 吴昱, 李继勇, 等. 经皮穴位电刺激对介入治疗脑损伤的保护作用观察[J]. 中国中西医结合杂志, 2015, 35(8): 971-974
Yuan Jun, Wu Yu, Li Ji-yong, et al. Protection of Transcutaneous Acupoint Electrical Stimulation for Brain Injury Undergoing Intervention: a Clinical Observation[J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine, 2015, 35(8): 971-974
- [13] 王颖, 李迪, 戴俭宇, 等. 电针内关穴及列缺穴对心肌缺血大鼠心肌细胞蛋白激酶表达的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2015, 35(3): 338-342
Wang Ying, Li Di, Dai Jian-yu, et al. Effect of Electro-acupuncture at Neiguan (PC6) and Lieque (LU7) on the Expression of Protein Kinases in Cardiomyocytes of Myocardial Ischemia Rats [J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine, 2015, 35(3): 338-342
- [14] 方先钧, 董莉. 针刺尺泽穴治疗顽固性呃逆 23 例 [J]. 中国针灸, 2015, 35(10): 1060
Fang Xian-jun, Dong Li. Acupuncture at Chize (LU 5) for 23 cases of intractable hiccup [J]. Chinese Acupuncture and Moxibustion, 2015, 35(10): 1060
- [15] 张采举, 杨帆, 李熲. 电针复合颈丛阻滞对甲状腺手术病人应激反应的影响[J]. 针刺研究, 2013, 38(1): 1-5
Zhang Cai-ju, Yang Fan, Li Man. Effect of Electroacupuncture Combined with Cervical Plexus Block on Stress Responses in Patients Undergoing Thyroid Surgery[J]. Acupuncture Research, 2013, 38(1): 1-5
- [16] 吴群, 莫云长, 黄陆平, 等. 经皮穴位电刺激联合丙泊酚靶控输注对开颅手术围术期应激反应的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(12): 1621-1625
Wu Qun, Mo Yun-chang, Huang Lu-ping, et al. Effect of Transcutaneous Acupoint Electrical Stimulation on stress in Brain Surgery with Propofol Target Controlled Infusion General Anesthesia [J]. Chinese journal of integrated traditional and western medicine, 2013, 33(12): 1621-1625
- [17] 幸志强, 任永功, 陶明哲, 等. 经皮穴位电刺激辅助静脉全麻行甲状腺次全切除术的价值研究 [J]. 现代中西医结合杂志, 2012, 21(19): 2065-2067
Xing Zhi-qiang, Ren Yong-gong, Tao Ming-zhe, et al. Study on the value of transcutaneous acupoint electrical stimulation with general intravenous anesthesia in subtotal thyroidectomy surgery [J]. Modern Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, 2012, 21(19): 2065-2067
- [18] Wang H, Xie Y, Zhang Q, et al. Transcutaneous electric acupoint stimulation reduces intra-operative remifentanyl consumption and alleviates postoperative side-effects in patients undergoing sinusotomy: a prospective, randomized, placebo-controlled trial [J]. Br J Anaesth, 2014, 112(6): 1075-1082
- [19] Chen Y, Yang Y, Yao Y, et al. Does transcutaneous electric acupoint stimulation improve the quality of recovery after thyroidectomy? A prospective randomized controlled trial[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(8): 13622-13627
- [20] Han JS. Acupuncture analgesia: areas of consensus and controversy [J]. Pain, 2011, 152(3-Sup): S41-48
- [21] Yoo YC, Oh JH, Kwon TD, et al. Analgesic mechanism of electroacupuncture in an arthritic pain model of rats: a neurotransmitter study[J]. Yonsei Med J, 2011, 52(6): 1016-1021
- [22] Su TF, Zhang LH, Peng M, et al. Cannabinoid CB2 receptors contribute to upregulation of beta-endorphin in inflamed skin tissues by electroacupuncture[J]. Mol Pain, 2011, 7(1): 98-111
- (上接第 69 页)
- [17] Kimura S, Fujita N, Noda T, et al. Monitoring autophagy in mammalian cultured cells through the dynamics of LC3[J]. Methods Enzymol, 2009, 452: 1-12
- [18] Kadowaki M, Karim MR. Cytosolic LC3 ratio as a quantitative index of macroautophagy[J]. Methods Enzymol, 2009, 452: 199-213
- [19] McKnight NC, Zhenyu Y. Beclin 1, an Essential Component and Master Regulator of PI3K-III in Health and Disease[J]. Curr Pathobiol Rep, 2013, 1(4): 231-238
- [20] Gao B, Wang Y, Qiu Y, et al. Bioinformatics screening regarding herbal components that targetedly regulate the function of tumour-associated macrophages[J]. Oncol Rep, 2014, 32(1): 309-317
- [21] Zhu H, Yu X, Zhu S, et al. The fusion of autophagosome with lysosome is impaired in L-arginine-induced acute pancreatitis [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(9): 11164-11170
- [22] Mareninova OA, Hermann K, French SW, et al. Impaired autophagic flux mediates acinar cell vacuole formation and trypsinogen activation in rodent models of acute pancreatitis[J]. J Clin Invest, 2009, 119(11): 3340-3355