



神经干细胞特异性 *LSD1* 基因敲除对小鼠情绪及记忆的影响

石昌杰,花秋红,张丽红,张儒*

(上海市信号转导与疾病研究重点实验室, 同济大学生命科学与技术学院, 上海 200092)

【摘要】 目的 条件敲除小鼠神经干细胞 *LSD1* 基因后,通过观察小鼠神经细胞增殖情况及小鼠行为的表现,揭示 *LSD1* 的神经生物学功能。方法 将 *LSD1*^(flox/flox) 转基因小鼠与神经干细胞特异性表达 Cre 重组酶的 *Nestin-cre*^(Tg) 转基因小鼠进行的杂交,即利用 Cre-LoxP 系统,繁殖出 *LSD1*^(flox/flox) *Nestin-cre*^(Tg) 基因型小鼠,即为所需神经干细胞 *LSD1* 条件性敲除小鼠 (*LSD1*-CKO), *LSD1*^(flox/flox) 做为对照小鼠。进一步运用免疫荧光染色方法检测小鼠海马 DG 区神经细胞的增殖;并通过小鼠的糖水偏好、强迫游泳及新物体识别等实验检测小鼠的行为表现。结果 与 *LSD1*^(flox/flox) 小鼠相比, *LSD1*-CKO 小鼠海马区神经细胞增殖显著降低 ($P = 0.023$);糖水偏好系数降低 ($P = 0.0075$);强迫游泳实验中不动时间明显增加 ($P < 0.05$);并在新物体识别实验中表现出记忆力显著下降现象 ($P = 0.0019$)。结论 小鼠脑神经干细胞敲除 *LSD1* 基因,海马区神经细胞增殖降低, *LSD1*-CKO 小鼠表现出负面情绪和记忆障碍。

【关键词】 赖氨酸特异的脱甲基酶 1;基因敲除;神经细胞增殖;情绪;记忆;小鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2017) 01-0079-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2017.01.015

Effects of neural stem cell *LSD1* conditional knockout on the mood and memory in mice

SHI Chang-jie, HUA Qiu-hong, ZHANG Li-hong, ZHANG Ru*

(Shanghai Key Laboratory of Signaling and Disease Research, School of Life Sciences and Technology, Tongji University, Shanghai 200092, China)

【Abstract】 **Objective** To study the function of *LSD1* in the development of neurons and the influence of *LSD1* on mood and memory-related behavior in mice. **Methods** The *LSD1*^(flox/flox) transgenic mice were crossed with *Nestin-cre*^(Tg) transgenic mice, using Cre-LoxP recombination system, to generate *LSD1* conditional knockout of neural stem cell (*LSD1*-CKO) mice, *LSD1*^(flox/flox) *Nestin-cre*^(Tg) mice, and *LSD1*^(flox/flox) mice as control. The neuron proliferation in *LSD1*-CKO mice was further detected by immunofluorescence staining. At the same time, the mood and memory-related behavior of *LSD1*-CKO mice were examined using several methods: sucrose preference test (SPT), forced swimming test (FST) and novel-object recognition (NOR) assay. **Results** In the *LSD1* brain-specific CKO mice, the neuron proliferation rate in the hippocampus was significantly reduced ($P = 0.023$), the preference for sucrose was reduced ($P = 0.0075$), immobility duration during the forced swimming test was increased ($P < 0.05$), and *LSD1*-CKO mice also exhibits memory-decline ($P = 0.0019$) during the novel-object recognition test. **Conclusions** Depletion of *LSD1* in mouse brain neural stem cells leads to significant reduction of the neuron proliferation in the hippocampus. *LSD1*-CKO mice show more negative emotions

[作者简介] 石昌杰(1981-),男,工程师,硕士,研究方向:神经疾病动物模型研究。E-mail: shichangjie@tongji.edu.cn

[通讯作者] 张儒,女,副教授, E-mail: ru.zhang@tongji.edu.cn

and memory impairment.

[Key words] LSD1; Gene knockout; Neuron proliferation; Mood; Memory; Mice

Corresponding author: ZHANG Ru, E-mail: ru.zhang@tongji.edu.cn

赖氨酸特异性组蛋白去甲基化基酶(lysine specific demethylase 1, LSD1)可以使组蛋白 H3 第四位上的赖氨酸(H3-K4)或 H3 第九位上的赖氨酸(H3-K9)脱去一个或二个甲基进而影响基因的转录水平。通常 H3-K4 脱甲基化抑制靶基因转录活性,而 H3-K9 脱甲基化则导致靶基因转录被激活^[1]。表观遗传调控在发育及疾病中起着重要作用,其中组蛋白赖氨酸甲基化和去甲基化介导的基因转录调控是表观遗传调控的重要组成部分。目前关于 LSD1 的研究主要集中在细胞水平,研究发现 LSD1 可以影响多种干细胞的增殖,如神经干细胞、肿瘤干细胞、胚胎干细胞等^[2]。而对 LSD1 在哺乳动物体内的研究,尤其是对体内神经细胞的调控功能研究较少。Nestin 是一种中间丝类型的蛋白,能够特异性的表达在神经干细胞(neural stem cell)上,为神经干细胞的特征性标志物。神经干细胞是一类具有分裂潜能的母细胞,具有分化为神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞的能力。鉴于 LSD1 基因全身敲除的小鼠具有胚胎致死性^[3],我们构建了 LSD1 基因条件性敲除小鼠(LSD1-CKO),即利用 Cre-LoxP 重组酶系统,条件性敲除小鼠脑神经干细胞中的 LSD1 基因,通过观察小鼠神经细胞增殖情况和行为的改变,来研究 LSD1 在哺乳动物体内的神经生物学功能。

1 材料与方法

1.1 试剂

鼠尾 PCR 试剂盒购(Selleck 公司);冰冻包埋液 NEG 50TM(Thermo);鼠抗 BrdU,兔抗 nestin,鼠抗 LSD1 一抗(Millipore 公司);相应二抗(Invetrogen 公司)。

1.2 仪器

PCR 仪(Eppendorf);凝胶成像仪(Tanon 3500R);冰冻切片(美康 Microm);激光共聚焦显微镜(Olympus FV10i);倒置荧光显微镜(Olympus);物体识别箱(上海吉量仪器)。

1.3 小鼠的饲养与繁殖

LSD1^(flox/flox)转基因小鼠在南方模式动物研究中心订制[SCXK(沪)2009-0023],此鼠与 Nestin-cre^(Tg)转基因小鼠(从同济大学实验动物中心丁玉

强老师获得)进行杂交,繁殖出 LSD1^(flox/wild) Nestin-cre^(Tg)双转基因小鼠。然后利用 LSD1^(flox/wild) Nestin-cre^(Tg)双转基因小鼠再与 LSD1^(flox/flox)转基因小鼠进行杂交,繁殖培育出在神经干细胞内特异敲除 LSD1 基因的 LSD1^(flox/flox) Nestin-cre^(Tg)小鼠(简称为 LSD1-CKO)。同窝 LSD1^(flox/flox)转基因小鼠(非敲除小鼠,简称为 LSD1^(f/f))为对照,并且行为学实验小鼠数目 *N* 值均大于 8。小鼠饲养繁殖于同济大学实验动物中心[SYXK(沪)2009-0022]SPF 级环境内,室温控制在 20~25℃,湿度控制在 40%~70%。

1.4 方法

1.4.1 LSD1-CKO 小鼠的 PCR 鉴定

Loxp 与 *Cre* 基因片段的鉴定,使用 Selleck 公司的鼠尾一步法 PCR 试剂盒。LSD1 基因上的 *Loxp* 基因片段鉴定,设计上游引物:5'-AAATGTTTCCTC-CGGGCCTC-3',下游引物:5'-GCAAATGAG-CAGAGACCAGC-3';PCR 条件为:94℃ 预变性 5 min,继之 94℃ 变性 30 s,60℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 1 min,共 35 个循环,最后 72℃ 延伸 5 min。*Loxp* 基因片段插入的后,PCR 扩增产物大小为 426 bp,而野生型未插入 *Loxp* 基因扩增产物为 356 bp。*Cre* 重组酶基因片段鉴定,上游引物:5'-TCGATG-CAACGAGTGATGAG-3',下游引物:5'-TCCAT-GAGTGAACGAACCTG-3';PCR 条件为:94℃ 预变性 5 min,然后 94℃ 变性 30 s,65℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 1 min,共 35 个循环,最后 72℃ 延伸 5 min。*Cre* 基因鉴定的 PCR 扩增产物大小为 300~400 bp。

1.4.2 LSD1 与 Nestin 荧光共染

4 周龄 LSD1^(f/f)和 LSD1-CKO 小鼠,心脏灌注后取脑,4% 多聚甲醛固定 24 h,30% 蔗糖脱水后包埋剂包埋,冰冻切片厚度为 30 μm。取海马区脑片,95℃ 预热柠檬酸钠缓冲液中水浴脑片 5 min,匀速慢摇 1 h 至室温,PBS 洗 3 次后,上 LSD1 和 Nestin 一抗(各 1:1000,0.3% Triton-X100,1% goat serum in PBS)4℃ 过夜;PBS 洗 3 次后换二抗(1:1000 goat anti rabbit 488 + 1:1000 goat anti mouse 546 in PBS)室温 1 h。Hoechst33342 染核后,封片后经激光共聚焦显微镜下观察拍照。

1.4.3 神经细胞增殖的 Brdu 染色

8 周龄 LSD1^(f/f)和 LSD1-CKO 小鼠,腹腔注射

BrdU 100 mg/kg, 每隔 2 h 注射 1 次, 共 5 次。第 2 天处死小鼠取脑, 脑片处理方法同上文。BrdU 染色: 每只小鼠取 6~8 片海马 DG 区脑片, PBS 洗三遍, 每次 5 min; 2 mol/L HCl (浓 HCl 用水 1:5 稀释) 处理 1 h; 换硼酸缓冲液 (A 液: 硼酸 3.1 g/500 mL, B 液: 硼酸钠·10H₂O 7.6 g/200 mL, 400 mL A + 100 mL B, pH 8.5) 处理 30 min, 然后 PBS 洗三遍, 每次 5 min; 上 BrdU 一抗体 (1:2000, 0.3% Triton-X100, 1% goat serum in PBS) 4 度过夜, PBS 洗 3 次后换二抗 (1:1000 goat anti-rat 488 in PBS) 室温 1 h。PBS 洗后封片, 倒置荧光显微镜下观察拍照。

1.4.4 糖水偏好实验

9 周龄 *LSD1^{f/f}* 和 *LSD1-CKO* 小鼠, 雌雄各半单笼放置。方法为每笼放置两个水瓶, 一个为无菌水, 另一个为 2% 的蔗糖水, 称重后放置 24 h, 小鼠自由进食进水。计算 24 h 内的糖水消耗占液体总消耗的百分比。

1.4.5 强迫游泳实验

糖水偏好实验结束后, 小鼠进行强迫游泳实验, 操作为每只小鼠分别放在水中游泳适应 15 min,

在 24 h 后, 每只小鼠再放水水中 6 min, 记录小鼠的不动时间。统计不动时间有两种方法: 前 5 min 内的不动时间; 后 4 min 内的不动时间。不动表现为不爬缸、不游动。不动时间反映小鼠的抑郁情绪。

1.4.6 新物体识别实验

10 周龄 *LSD1^{f/f}* 和 *LSD1-CKO* 小鼠进行新物体识别实验, 方法参照我们实验室之前发论文^[4]。识别指数 (recognition index) = 新物体识别时间/新物体 + 旧物体识别的总时间。

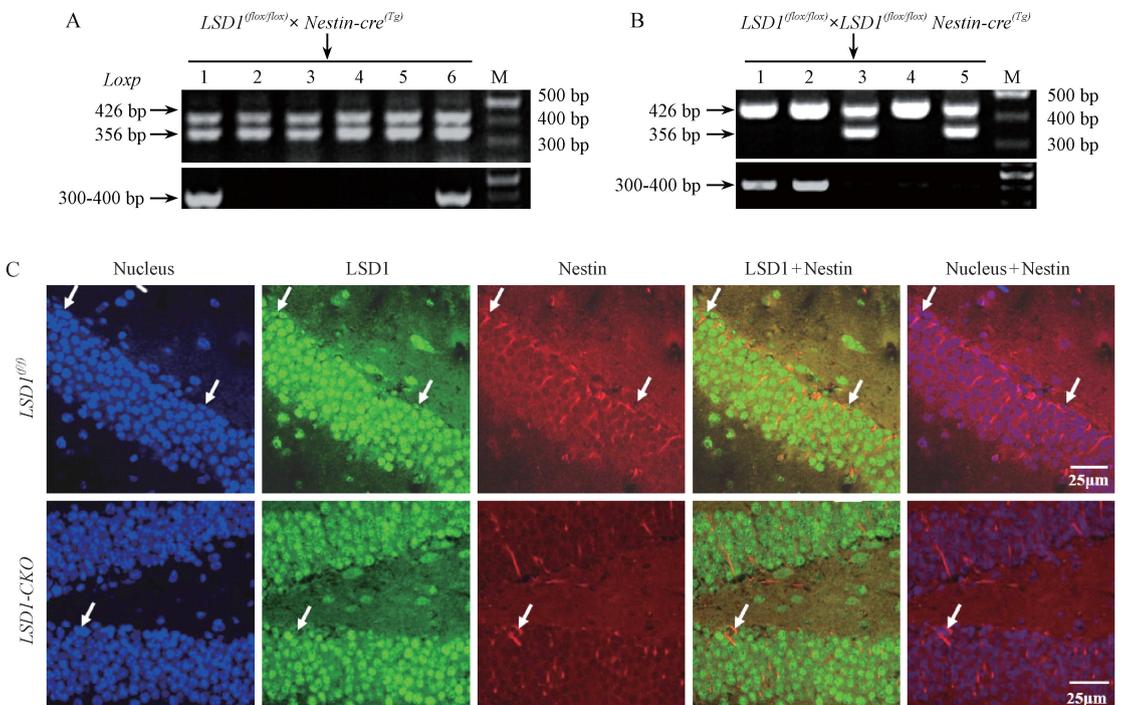
1.5 数据统计

实验数据以 mean ± S. E. M. 形式表示, 利用统计学软件 Graphpad Prism 5.0 对数据进行分析, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 神经干细胞 *LSD1* 基因敲除小鼠的基因鉴定及免疫荧光染色

图 1A-B 为 *LSD1-CKO* 小鼠的繁殖策略及后代 PCR 鉴定电泳结果。图 A 中标记 1 和 6 号小鼠为 *LSD1^(flox/wild) Nestin-cre^(Tg)* 小鼠。图 B 中标记为 1 和



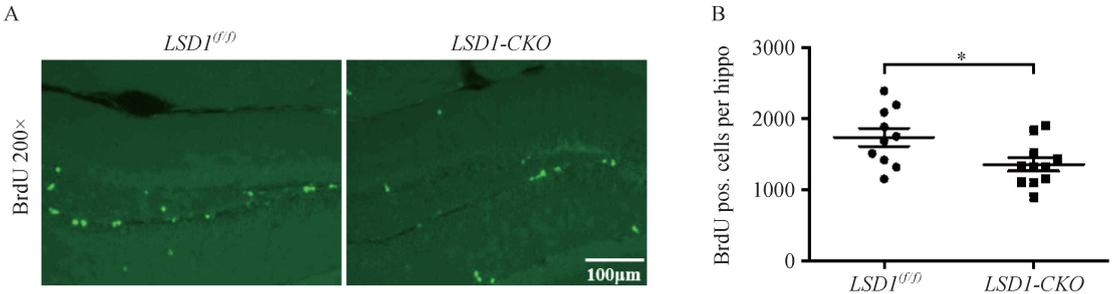
注: A: *LSD1^(flox/flox)* 与 *nestin-cre^(Tg)* 小鼠杂交后代鉴定; B: *LSD1^(flox/flox)* 与 *LSD1^(flox/wild) nestin-cre^(Tg)* 小鼠杂交后代 *LSD1^(flox/flox) nestin-cre^(Tg)* 鉴定 (1/4 纯合敲除); C: *LSD1* 和 *nestin* 的免疫荧光共染色。

图 1 神经干细胞 *LSD1* 基因特异性敲除小鼠的基因鉴定及免疫荧光染色

Note. A: Identification of *LSD1^(flox/wild) Nestin-cre^(Tg)* offsprings. B: Identification of *LSD1^(flox/flox) nestin-cre^(Tg)* (1/4 chance) offsprings. C: Immunofluorescence staining of *LSD1* and *nestin*.

Fig. 1 Generation of *LSD1-CKO* mice and immunofluorescence staining

2 号的小鼠为神经干细胞 *LSD1* 特异性敲除小鼠 *LSD1*^{(*flax/flax*)*Nestin-cre*(*Tg*)}; 4 号 *LSD1*^(*flax/flax*) 为非条件敲除小鼠对照。为进一步观察 *LSD1*-CKO 小鼠在 *nestin* 表达阳性细胞内是否无 *LSD1* 表达, 我们共染了 *LSD1* 与 *nestin*。荧光染色结果显示, 在 *LSD1*^(*fl/fl*) 小鼠海马区, 表达 *nestin* (红色) 的细胞内有 *LSD1* (绿色) 表达, 而在条件敲除小鼠中, *nestin* 标记的细胞中无 *LSD1* 表达, 表明在 *LSD1*-CKO 小鼠中表达 *nestin* 阳性细胞内, *LSD1* 确实被敲除而不再表达 (图 1C)。



注: A: 海马区细胞增殖的 BrdU 荧光染色 ($\times 200$); B: 阳性 BrdU 细胞个数统计, $P = 0.023$ 。

图 2 海马区神经细胞增殖的 BrdU 染色

Note. A: Fluorescent staining of BrdU in the hippocampus, $\times 200$. B: Count of positive BrdU-stained cells, $P = 0.023$.

Fig. 2 Proliferation of neural cells in the hippocampus. BrdU staining

2.3 行为学改变

2.3.1 条件敲除 *LSD1* 对小鼠情绪影响

神经干细胞的增殖抑制是抑郁症的关键因素, 所以 *LSD1*-CKO 小鼠海马区神经细胞增殖数目减少及神经干细胞中 *LSD1* 失活, 可能会对小鼠情绪造成影响。在对小鼠进行了糖水偏好实验后, 发现 *LSD1*-CKO 小鼠对糖水的依赖性降低 ($P = 0.0075$), 即糖水快感降低 (图 3A)。小鼠强迫游泳实验结果显示, *LSD1*-CKO 小鼠无论是在前 5 min,

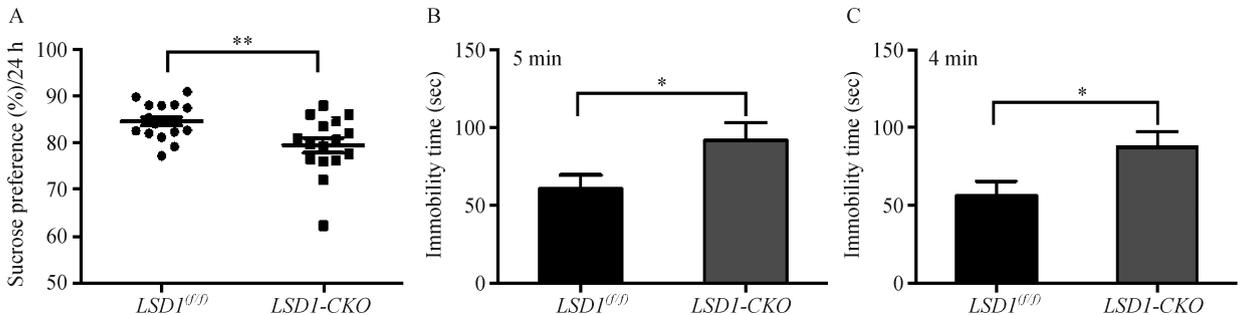
2.2 神经细胞增殖的 BrdU 染色

通过 BrdU 染色实验, 观察了敲除小鼠的神经细胞的增殖情况, 亮绿色为标记的阳性增殖细胞 (图 2A)。并对 BrdU 阳性细胞个数做了统计 (图 2B), 结果显示与对照小鼠相比, 敲除小鼠的 BrdU 阳性细胞数目变少, 即增殖降低, 统计具有显著差异 ($P = 0.023$)。这与 Sun 等^[5]抑制 *LSD1* 的活性或 siRNA 敲除 *LSD1* 的表达后, 所看到的致神经干细胞增殖能力下降及导致野生鼠大脑海马齿状回细胞增殖的大幅减少这些现象, 具有一致性。

还是在后 4 min 中内, 与 *LSD1*^(*fl/fl*) 小鼠相比, 不动时间都明显增加 ($P = 0.03$ 或 $P = 0.029$, 见图 3B-C)。糖水偏好实验和强迫游泳实验是判断小鼠是否具有一定的抑郁症的两种快速简单的方法^[6]。从这两个实验我们初步判断这种 *LSD1*-CKO 小鼠具有情绪低落的抑郁症状。

2.3.2 条件敲除 *LSD1* 对小鼠记忆的影响

条件敲除 *LSD1* 后导致海马区神经细胞增殖的降低, 而海马是小鼠学习记忆的主要脑区部分^[7],



注: A: 糖水偏好统计, $P = 0.0075$; B: 强迫游泳前 5 min 内不动时间统计, $P = 0.03$; C: 强迫游泳后 4 min 内不动时间统计, $P = 0.029$ 。

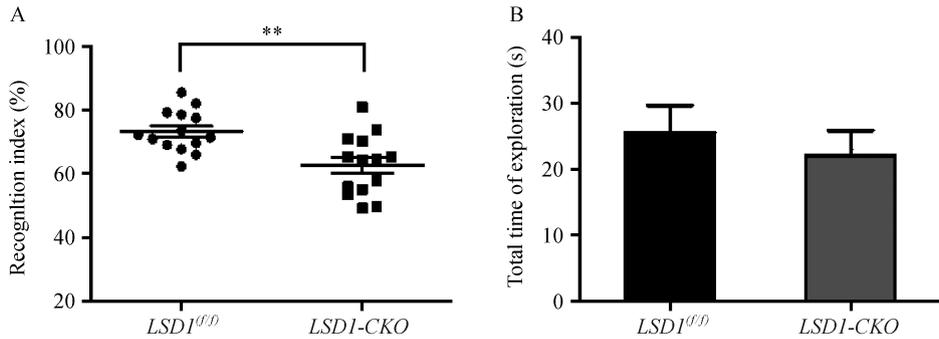
图 3 *LSD1*-CKO 小鼠抑郁症表现

Note. A: Results of sucrose preference test, $P = 0.0075$. B: Immobility time at 5 minutes before forced swimming test, $P = 0.03$. C: Immobility time at 4 minutes after forced swimming test, $P = 0.029$.

Fig. 3 Depressive behavior of the *LSD1*-CKO mice

所以条件敲除 *LSD1* 是否对小鼠的记忆产生影响, 尚未有文献报道。新物体识别实验, 是利用动物先天对新物体有探索倾向的特性而建立的非空间短期记忆测试方法^[4]。我们应用新物体识别实验, 在 10 周龄时, 检测了条件敲除小鼠的记忆力情

况。统计结果显示 *LSD1* 敲除后, 小鼠对新物体的识别系数降低 ($P = 0.0019$), 即记忆障碍。实验同时发现, *LSD1*-CKO 小鼠还表现出对新旧两个物体总探索时间降低的趋势, 也反映出 *LSD1*-CKO 小鼠运动活跃程度降低, 结果见图 4A-B。



注:A:小鼠新物体识别指数, $P = 0.0019$; B:小鼠探索新旧物体的总时间。

图 4 新物体识别实验

Note. A: Object recognition index, $P = 0.0019$. B: Total time of exploration (s) in the object recognition test.

Fig. 4 Novel object recognition test

3 讨论

组蛋白氨基端的共价修饰大多是可逆的, 如组蛋白的乙酰化、磷酸化和泛素化等。然而组蛋白甲基化的发生, 在很长一段时间被认为是非常稳定且不可逆的, 直到 2004 年 Shi 等^[8]发现了第一个赖氨酸特异性组蛋白去甲基化酶 1 (lysine specific demethylase 1, *LSD1*)才改变了科研人员对组蛋白甲基化修饰机制的认知, 组蛋白修饰在基因调节过程中更具动态性。

关于 *LSD1* 最初的研究, 主要集中在肿瘤的发生发展中的作用, *LSD1* 也成为抗肿瘤药物新的靶点。随着不断深入的对 *LSD1* 调节组蛋白甲基化修饰机制的研究, 发现 *LSD1* 参与了动植物胚胎发育、干细胞分化、免疫等多种生物学功能, 与很多疾病发生有着密切的关系^[2,9,10]。

有文献报道, *LSD1* 在斑马鱼神经细胞发育及体外干细胞增殖分化上具有重要作用^[5,11]。全身敲除 *LSD1* 导致围产期小鼠死亡, 也充分体现了 *LSD1* 在哺乳动物发育中的重要作用。为了更好的观察 *LSD1* 基因缺失后, 在体神经发生及神经功能行为体现, 课题组制作并繁殖出神经干细胞 *LSD1* 基因敲除小鼠。条件敲除小鼠的 nestin 荧光标记细胞中不表达 *LSD1*。神经干细胞内的 *LSD1* 基因敲除并不导致小鼠的死亡, 但是条件敲除小鼠海马 DG 区 Brdu 标记后, 染色显示神经细胞增殖降低。对于沉默

LSD1 导致细胞增殖降低, 也存在多种可能机制^[1,2]。海马在小鼠的学习记忆及情绪活动中具有重要作用, 海马 DG 区神经细胞的增殖降低可能会对小鼠学习记忆及情绪产生影响。在利用糖水消耗实验、强迫游泳及新物体识别实验的行为学实验中, 9~10 周龄的 *LSD1*-CKO 小鼠就表现出了抑郁症及记忆力下降的症状, 揭示条件敲除神经干细胞 *LSD1* 基因后, 会导致情绪及记忆障碍。Jarome 等^[12]认为, 组蛋白甲基化是记忆和行为的关键调节者。神经干细胞及之后分化的各类神经细胞内组蛋白的甲基化与脱甲基化, 进一步会影响到 DNA 甲基化与脱甲基化的调节, 而这可能是情绪抑制和认知损伤的因素。所以 *LSD1* 对组蛋白的甲基化与脱甲基化修饰的调节, 对动物的行为及认知可能具有重要的调节作用, 但是具体的作用机制尚不清楚。

基于 *LSD1* 在小鼠神经发生、学习记忆及情绪表现行为方面的作用, 我们认为 *LSD1* 的调节机制与功能, 可能为抑郁与神经退行性疾病治疗提供一种新的思路, 当然还需要进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] 邵根宝, 黄晓佳, 龚爱华, 等. 组蛋白去甲基化酶 *LSD1* 及其生物学功能 [J]. 遗传, 2010, 32(4): 331-338.
- [2] 闫红杰, 齐晖, 王云帅, 等. 组蛋白去甲基化酶 1 在干细胞增殖与分化中的调控作用 [J]. 生命科学, 2012, 24(7): 646-651.
- [3] Wang J, Scully K, Zhu X, et al. Opposing *LSD1* complexes function in developmental gene activation and repression pro-

- gramms [J]. *Nature*, 2007, 446(7138): 882–887.
- [4] Zhang R, Xue GZ, Wang SD, et al. Novel object recognition as a facile behavior test for evaluating drug effects in a PP/PSI Alzheimer's disease mouse model [J]. *J Alzheimer's Dis*, 2012, 31(4): 801–812.
- [5] Sun GQ, Alzayady K, Stewart R, et al. Histone demethylase LSD1 regulates neural stem cell proliferation [J]. *Mol Cell Biol*, 2010, 30(8): 1997–2005.
- [6] 薛涛, 邬丽莎, 刘新民, 等. 抑郁症动物模型及评价方法研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2015, 23(3): 321–326.
- [7] 丁艳平, 邵宝平, 董辉, 等. 胎次、性别对成年小鼠海马区齿状回神经发生及学习记忆的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2013, 21(3): 7–11
- [8] Shi Y, Lan F, Matson C, et al. Histone demethylation mediated by nuclear amine oxidase homolog LSD1 [J]. *Cell*, 2004, 119(7): 941–953.
- [9] 张武文, 李逸平. 组蛋白甲基化修饰酶与早期胚胎发育 [J]. *生命科学*, 2012, 24(7): 653–659
- [10] Sakane N, Kwon HS, Pagans S, et al. Activation of HIV transcription by the viral Tat protein requires a demethylation step mediated by lysine-specific demethylase 1 (LSD1/KDM1) [J]. *PLoS Pathog*, 2011, 7(8): e1002184.
- [11] 张洁. LSD1 对斑马鱼发育的影响及其机制的初步研究 [D]. 上海: 复旦大学, 2009.
- [12] Jarome TJ, Lubin FD. Histone lysine methylation: critical regulator of memory and behavior [J]. *Rev Neurosci*, 2013, 24(4): 375–387.

[收稿日期] 2016–05–18

(上接第 78 页)

- worsens adipose tissue macrophage accumulation and atherosclerosis in obese LDL receptor-deficient mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, 28(4): 685–691.
- [5] Chung S, Cuffe H, Marshall SM, et al. Dietary cholesterol promotes adipocyte hypertrophy and adipose tissue inflammation in visceral, but not subcutaneous fat in monkeys [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014, 34(9): 1880–1887.
- [6] 蔡兆伟, 潘永明, 陈亮, 等. 睾酮缺乏对高脂饮食小型猪血脂和肝内脂质沉积的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2015, 25(1): 40–44.
- [7] Dubois V, Laurent MR, Jardí F, et al. Androgen deficiency exacerbates high-fat diet-induced metabolic alterations in male mice [J]. *Endocrinology*, 2015, 157(2): 648–665.
- [8] Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89(6): 2548–2556.
- [9] 朱大龙, 童国玉. 血清淀粉样蛋白 A-联系肥胖及其代谢合并症的促炎性脂肪细胞因子 [J]. *国际内分泌代谢杂志*, 2006, 26(3): 205–206.
- [10] de Oliveira EM, Ascar TP, Silva J C, et al. Serum amyloid A links endotoxaemia to weight gain and insulin resistance in mice [J]. *Diabetologia*, 2016; 59(8): 1–9.
- [11] Starr AE, Dufour A, Maier J, et al. Biochemical analysis of matrix metalloproteinase activation of chemokines CCL15 and CCL23 and increased glycosaminoglycan binding of CCL16 [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(8): 5848–5860.
- [12] Kang YE, Kim JM, Joung KH, et al. The roles of adipokines, proinflammatory cytokines, and adipose tissue macrophages in obesity-associated insulin resistance in modest obesity and early metabolic dysfunction [J]. *PLoS One*, 2016, 11(4): e0154003.

[收稿日期] 2016–06–23