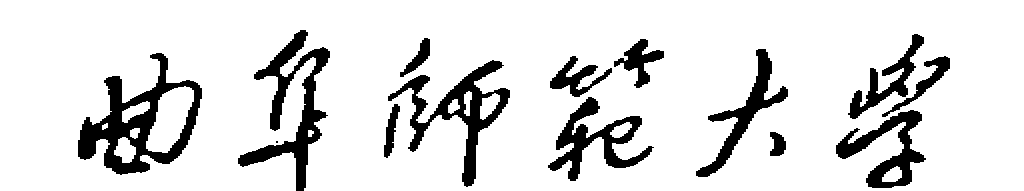
分类号：G804.2 学校单位代码：10446



硕 士 学 位 论 文

**论文题目：IL-15 抑制内质网应激改善胰岛素抵抗**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 研 究 生 姓 名 | ： | 罗立杰 |
| 学 科、专 业 | ： | 运动人体科学 |
| 研 究 方 向 | ： | 运动生理学 |
| 导师姓名、职称 | ： | 刘洪珍 教 授 |
|  |  | 张 靓 副教授 |
| 论文完成时间 | ： | 2013 年 5 月 |

曲阜师范大学研究Th学位论文原创性说明

（根据学位论文类型相应地在“□”划“√”）

本人郑重声明：此处所提交的博士□/硕士□论文《IL-15 抑制内质网应激改善胰岛素抵抗》，是本人在导师指导下，在曲阜师范大学攻读博士□/硕 士□学位期间独立进行研究工作所取得的成果。论文中除注明部分外不包含 他人已经发表或撰写的研究成果。对本文的研究工作做出重要贡献的个人和 集体，均已在文中以明确的方式注明。本声明的法律结果将完全由本人承担。

作者签名： 日期：

曲阜师范大学研究Th学位论文使用授权书

（根据学位论文类型相应地在“□”划“√”）

《IL-15 抑制内质网应激改善胰岛素抵抗》系本人在曲阜师范大学攻读博士□/硕士□学位期间，在导师指导下完成的博士□/硕士□学位论文。本论文的研究成果归曲阜师范大学所有，本论文的研究内容不得以其他单位的名义发表。本人完全了解曲阜师范大学关于保存、使用学位论文的规定，同意学校保留并向有关部门送交论文的复印件和电子版本，允许论文被查阅和借阅。本人授权曲阜师范大学，可以采用影印或其他复制手段保存论文，可以公开发表论文的全部或部分内容。

作者签名： 日期：

导师签名： 日期：

**IL-15抑制内质网应激改善胰岛素抵抗**

摘 **要**

研究目的：

探讨IL-15改善胰岛素抵抗的作用是否通过抑制内质网应激介导。

研究方法：

选取260g左右雄性SD大鼠，腹腔注射20%乌拉坦麻醉后，取比目鱼肌、腓肠肌，用刀片将组织切成25~30mg左右肌丝放入2个24孔板，加入1ml含有2%BSA的DMED液，分别用大头针将其固定使孵育时骨骼肌有一定的张力，孵育过程中持续充入混合气体

（95%O2, 5%CO2），预孵育30min后，分别加入10ng/ml和100ng/ml IL-15, 30min后按分组分别加入10ug/mL Tm和10ul 2mmol/L DTT，将24孔板置于水浴摇床中，45次/min震荡，并加热维持37℃恒温，3h后终止孵育，取出骨骼肌以蛋白免疫印迹方法测定比目鱼肌和腓肠肌的GRP78、GRP94、CHOP蛋白表达变化。

研究结果：

与对照组相比，IL-15 能够明显降低Tm、DTT 诱导的骨骼肌内质网应激标记蛋白

GRP78、GRP94水平，改善胰岛素抵抗；能够明显降低内质网应激引起的CHOP蛋白表达水平，抵制细胞凋亡。

研究结论：

IL-15改善胰岛素抵抗的效应可能是通过抑制内质网应激机制。

**关键词：**IL-15；内质网应激；胰岛素抵抗；骨骼肌

**Inhibition of endoplasm reticulum stress by ghrelin protects against insulin resistance**

**Abstract**

Objective:

Investigate whether IL-15 resulted in improving insulin resistance through inhibition of endoplasmic reticulum stress.

Methods:

Select probably 260g male SD rats, intraperitoneal injection of 20% urethane after anesthesia, anatomy soleus, gastrocnemius, the tissues were cut into about 25

~ 30mg myofilament with a blade, placed in two 24-well plates, add 1 mL DMED containing 2% BSA, with the pins fixed respectively, so that the skeletal muscles incubated with a certain tension, continued to charge into the gas mixture (95% O2, 5% CO2) during incubation, pre-incubated for 30min, adding 10ng/ml and 100ng/ml IL-15 respectively, after 30min added of 10ug/mL Tm and 10ul 2mmol / L DTT, 24-well plates in a water bath shaker, 45 times / min shock and heat to

Maintain a constant temperature of 37℃, Termination of the incubation after 3h.

Remove skeletal muscle determination soleus and gastrocnemius protein expression: GRP78, GRP94, CHOP by using Western blot method.

Results:

Compared with the control group, IL-15 can significantly reduces endoplasmic reticulum stress marker protein in the skeletal muscle of GRP78, GRP94 induced by Tm, DTT, and improves insulin resistance; significantly reduce CHOP protein expression level caused by endoplasmic reticulum stress, resist apoptosis.

Conclusion:

The effect of IL-15 to improve insulin resistance may be through inhibition of endoplasmic reticulum stress mechanism.

**KEYWORDS:** interleukin-15; Endoplasmic reticulum stress; Insulin resistance; Skeletal muscle

目 录

[摘](#_Toc686523986)[要](#_Toc686523986) 2

**[Abstract](#_Toc686523987)** 3

**[1](#_Toc686523988)** [选题依据](#_Toc686523988) 6

**[2](#_Toc686523989)** [文献综述](#_Toc686523989) 6

**[2.1](#_Toc686523990)****[IL-15](#_Toc686523990)** 6

**[2.2](#_Toc686523991)** [内质网应激](#_Toc686523991) 6

**[2.2.1](#_Toc686523992)** [内质网应激机制](#_Toc686523992) 6

**[2.2.2](#_Toc686523993)** [内质网应激效应](#_Toc686523993) 6

**[2.3](#_Toc686523994)** [胰岛素抵抗](#_Toc686523994) 7

**[2.4](#_Toc686523995)****[IL-15](#_Toc686523995)**[与胰岛素抵抗](#_Toc686523995) 7

**[2.5](#_Toc686523996)** [内质网应激与胰岛素抵抗](#_Toc686523996) 7

**[2.5.1](#_Toc686523997)** [内质网应激与胰岛素抵抗机制](#_Toc686523997) 7

**[2.5.2](#_Toc686523998)** [内质网应激与骨骼肌胰岛素抵抗](#_Toc686523998) 7

**[3](#_Toc686523999)** [材料与方法](#_Toc686523999) 7

**[3.1](#_Toc686524000)** [实验动物与分组](#_Toc686524000) 7

**[3.1.1](#_Toc686524001)** [实验动物](#_Toc686524001) 7

**[3.1.2](#_Toc686524002)** [实验分组](#_Toc686524002) 7

**[3.2](#_Toc686524003)** [主要试剂](#_Toc686524003) 9

**[3.2.1](#_Toc686524004)** [抗体](#_Toc686524004) 9

**[3.2.2](#_Toc686524005)** [药物](#_Toc686524005) 9

**[3.2.3](#_Toc686524006)****[Westernblot](#_Toc686524006)**[相关试剂](#_Toc686524006) 9

**[3.2.4](#_Toc686524007)** [其他试剂](#_Toc686524007) 9

**[3.3](#_Toc686524008)** [主要仪器](#_Toc686524008) 9

**[3.4](#_Toc686524009)** [常用溶液配制](#_Toc686524009) 9

**[3.5](#_Toc686524010)**[实验方法](#_Toc686524010) 11

**[3.5.1](#_Toc686524011)** [骨骼肌组织离体孵育](#_Toc686524011) 11

**[3.5.2](#_Toc686524012)** [蛋白含量测定](#_Toc686524012) 11

**[3.5.2.1](#_Toc686524013)** [测定原理](#_Toc686524013) 12

**[3.5.2.2](#_Toc686524014)** [试剂配制](#_Toc686524014) 12

**[3.5.2.3](#_Toc686524015)** [蛋白标准曲线制作](#_Toc686524015) 12

**[3.5.2.4](#_Toc686524016)** [样品蛋白含量测定](#_Toc686524016) 12

**[3.5.3](#_Toc686524017)** [蛋白印迹](#_Toc686524017)**[(Westernblot)](#_Toc686524017)** 12

**[3.5.3.1](#_Toc686524018)** [样品制备—组织蛋白提取](#_Toc686524018) 13

**[3.5.3.2 SDS](#_Toc686524019)**[聚丙烯酰胺凝胶的配制和电泳](#_Toc686524019)**[(](#_Toc686524019)**[参考《分子克隆实验指南》](#_Toc686524019)**[)](#_Toc686524019)** 13

**[3.5.3.3](#_Toc686524020)** [转膜](#_Toc686524020) 13

**[3.5.3.4](#_Toc686524021)** [封闭](#_Toc686524021) 13

**[3.5.3.5](#_Toc686524022)** [抗体杂交孵育](#_Toc686524022) 13

**[3.5.3.6](#_Toc686524023)** [发光](#_Toc686524023) 13

**[3.6](#_Toc686524024)** [统计学方法](#_Toc686524024) 13

**[4](#_Toc686524025)** [实验结果](#_Toc686524025) 13

**[4.1](#_Toc686524026)****[IL-15](#_Toc686524026)**[能够抑制](#_Toc686524026)**[Tm](#_Toc686524026)**[诱导的骨骼肌内质网应激](#_Toc686524026) 13

**[4.1.1](#_Toc686524027)****[IL-15](#_Toc686524027)**[抑制](#_Toc686524027)**[Tm](#_Toc686524027)**[诱导的比目鱼肌内质网应激](#_Toc686524027) 13

**[4.1.2](#_Toc686524028)****[IL-15](#_Toc686524028)**[抑制](#_Toc686524028)**[Tm](#_Toc686524028)**[诱导的白腓肠肌内质网应激](#_Toc686524028) 13

**[4.2](#_Toc686524029)****[IL-15](#_Toc686524029)**[能够抑制](#_Toc686524029)**[DTT](#_Toc686524029)**[诱导的骨骼肌内质网应激](#_Toc686524029) 14

**[4.2.1](#_Toc686524030)****[IL-15](#_Toc686524030)**[抑制](#_Toc686524030)**[DTT](#_Toc686524030)**[诱导比目鱼肌内质网应激](#_Toc686524030) 14

**[4.2.2](#_Toc686524031)****[IL-15](#_Toc686524031)**[抑制](#_Toc686524031)**[DTT](#_Toc686524031)**[诱导的白腓肠肌内质网应激](#_Toc686524031) 14

**[4.3](#_Toc686524032)****[IL-15](#_Toc686524032)**[能够抑制](#_Toc686524032)**[Tm/DTT](#_Toc686524032)**[诱导下骨骼肌的](#_Toc686524032)**[CHOP](#_Toc686524032)**[蛋白表达](#_Toc686524032) 14

**[5](#_Toc686524033)** [讨论](#_Toc686524033) 14

**[6](#_Toc686524034)** [结论](#_Toc686524034) 15

[参考文献](#_Toc686524035) 15

缩略词表(ABBREVIATIONS)

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 英文缩写 | 英文全称 | 中文全称 |
| 2.1 IL-15 | Interleukin-15 | 白介素-15 |
| IL-15Rα | Interleukin-15 receptor α | 白介素-15 受体 α |
| PBS | Phosphate buffer solution | 磷酸盐缓冲液 |
| Ras | Renin angiotensin system | 肾素-血管紧张素系统 |
| MAPK | Mitogen-activated proteinkinase | 促分裂原活化蛋白激酶 |
| Jak | C-Jun N-terminal kinase c-Jun | 氨基末端激酶 |
| STAT | Signal transducers andactivators of transcription | 信号传导蛋白和转录激活 |
| Tm | tunicamycin | N-糖链的抑制剂衣霉素 |
| DTT | Dithiothreitol | 二硫苏糖醇 |
| GRP78 | Glucose regulated protein 78 | 葡萄糖调节蛋白 78 |
| GRP94 | Glucose regulated protein 94 | 葡萄糖调节蛋白 94 |
| CHOP | CCAAT/enhancer binding protein homologous  protein | CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白 |
| UPR | Unfolded protein response | 未折叠蛋白反应 |
| ERS | Endoplasmic reticulum stress | 内质网应激 |
| EOR | Endoplasmic ret iculum overload response | 内质网超负荷反应 |
| IRS-1 | Insulin receptor substrate-1 | 胰岛素受体底物-1 |
| JNK | C- jun NH2 terminal k-inase | c- jun 氨基末端激酶 |
| PDI | Protein disulfide isomerase | 蛋白二硫键异构酶 |
| SERCA | Sarco/ endoret iculum Ca2+-ATPase | 内质网 Ca2+-ATP 酶 |
| HO-1 | Heme oxygenase-1 | 血红素加氧酶-1 |
| SERP1 | Stress associated endoplasmicret iculum protein 1 | 应激相关的内质网蛋白 1 |
| IR | Insulin resistance | 胰岛素抵抗 |

# **1** 选题依据

白介素-15（interleukin, IL-15）是近年发现的一种新的肌肉因子，是细胞因子家族成员之一，在骨骼肌中呈现高表达。动物实验研究表明，骨骼肌的IL-15通过旁分泌/自分泌的形式不仅作用于骨骼肌自身，促进骨骼肌蛋白合成、葡萄糖摄入和脂肪氧化，抑制骨骼肌蛋白质降解，还可通过血液循环内分泌的形式到达脂肪组织，抑制脂肪的合成，促进脂肪的分解、抑制脂肪细胞的分化，是骨骼肌-脂肪内分泌轴(muscle to fat endocrine axis)的主要信使分子[1]，更为有意义的是骨骼肌分泌的IL-15有可能作为一种重要的炎症因子参与炎症、肿瘤、II型糖尿病和动脉粥样硬化的发生。目前研究表明IL-15能够间接改变一些疾病的胰岛素抵抗，而内质网应激不仅可以引起胰岛素抵抗，也是导致胰岛β细胞功能减退的重要机制。IL-15是否通过内质网应激来改善胰岛素抵抗将是我们进行研究的重点。本实验通过IL-15孵育骨骼肌离体组织，研究IL-15对于内质网应激及胰岛素抵抗的作用机制，从而探讨外源性给予IL-15对骨骼肌内质网应激的影响机制，为防治因胰岛素抵抗引起的肥胖、II型糖尿病、心血管疾病等寻找新的方法。

# **2** 文献综述

## **2.1** **IL-15**

白介素(interleukin, IL) -15 最早是由Grabstein 等1994 年在猴肾内皮细胞株CV-1

/EBNA的上清液中首次发现的具有促进抗肿瘤反应的细胞因子。成熟IL-15蛋白主要由基因第5、6、7、8号外显子翻译获得，共有114个氨基酸组成，分子质量14-15 kD，在Cys42-Cys88和Cys35-Cys85之间包含2个二硫键，其羧基末端含有2个N-糖基化位点(N79和N112)，在氨基酸1-15、18-57、65-78和97-114处具有明显的螺旋结构，属于四螺旋细胞因子家族。Northern blot分析显示IL-15 mRNA广泛存在于各种细胞和组织内，如上皮细胞、单核细胞、骨骼肌细胞及胎盘中高表达IL-15 mRNA，心、肺、肝和肾等组织也有一定水平的IL-15 mRNA表达[2]。IL-15受体为一种复杂的异源三聚体形式，属于造血生长因子受体超家族成员之一，由α、β和γc 3 个亚基构成。其中β亚基与IL-2受体共用，

γc亚基与多种白介素受体共用，而α亚基是IL-15所特有的。IL-15Rα为I型跨膜蛋白，

N末端的Sushi位点决定IL-15受体与其配体结合的亲和性。最新研究表明IL-15Rα在信号转导中扮演重要角色。但是IL-15Rα在此过程中并不单独发挥作用，只有在IL-2/IL-15Rβ和γc存在的情况下才能进行信号转导。IL-15发挥其生物学效应主要是通过IL-15与其受体结合后激活Jak/STAT通路[3]和Ras/MAPK通路实现。与IL-15 mRNA类似，IL-15Rα

mRNA也在多个细胞和组织中表达，如T细胞、B细胞、中性粒细胞和NK细胞等，以及骨骼肌、脂肪组织、脑、心、肺、肝和肾等。目前研究发现IL-15能够间接改变II型糖尿病人的胰岛素抵抗。

## **2.2** 内质网应激

### **2.2.1** 内质网应激机制

内质网是细胞加工蛋白质和贮存Ca2+的主要场所，对应激极为敏感，其功能紊乱时出现错误折叠与未折叠蛋白在腔内聚集以及Ca2+平衡紊乱的状态，称为内质网应激(endoplasmic reticulum stress)。内质网应激对应激细胞的抵抗、适应、损伤或凋亡有重要作用，最近几年有关其信号通路与效应的研究非常活跃。诱发内质网应激的理化因素包括很多：如紫外线、营养物质缺失、缺氧、氧化应激、高浓度同型半胱氨酸、病毒、毒性物质（如重金属） 等， 内质网Ca2+强烈释放剂、内质网Ca2+-ATP 酶抑制剂、钙离子载体( Ca2+ionophore)、蛋白质糖基化与折叠抑制剂等化学试剂也能够诱发内质网应激。

内质网应激主要激活三条信号通路[4]：未折叠蛋白反应( unfolded protein response, UPR), 固醇调节级联反应和内质网超负荷反应( endoplasmic ret iculum overload response,

EOR）。未折叠蛋白反应涉及激活三种内质网膜结合蛋白：PKR-like，即真核生物起始因子

2A蛋白激酶（PERK），肌醇所需的en-zy me 1（IRE1），和激活转录因子-6（ATF6），和上调基因编码的ER伴侣蛋白，如BiP/GRP78和GRP94，他们可以反过来增强ER蛋白折叠的能力。此外，激活的UPR抑制翻译的进行，并降低的蛋白质的合成，防止ER蛋白的进一步的积累折叠。与此相反，EOR涉及上调的核因子-κB（NF-κB）的炎症反应的途径和调制。由于这些适应机制的成功的激活，内质网应激得到解决，这个结果不会发生，功能受损细胞启动的终端细胞死亡机制。这些细胞的死亡事件是介导的转录激活的基因编码的胆固醇氧化酶- 过氧化物酶C / EBP 同源性蛋白（也被称为DNA 损伤153

[GADD153]），一部分是由CCAAT/增强子结合蛋白家族的转录因子；丝裂原活化蛋白激酶c-Jun N-末端激酶（JNK）和Bcl-2家族蛋白和ER相关的半胱天冬酶。通过化学诱导剂或转基因使GRP78、GRP94等分子伴侣高表达可减轻甚至取消内质网应激、促进细胞存活，也就是说内质网应激效应伴随着GRP78和GRP94的变化，可根据这两种蛋白的表达变化研究内质网应激效应。过强的内质网应激诱导细胞凋亡，内质网既含有促进凋亡的因子如caspase-12、CHOP/GADD153、Cnx1，也含有抑制因子如Bax inhibitorI、Bap31、GRP78、

PDI、ORP150。诱导CHOP表达：CHOP( C/ EBPhomology protein)属于C/ EBP转录因子家族，常与该家族的其它成员形成二聚体，其基因含有ERSE,可被内质网应激诱导表达继而促进凋亡，机制包括下调Bcl2表达、耗竭谷胱甘肽、促进反应性氧族产生等（McCullough.

2001）. CHOP基因敲除可增强细胞抗内质网应激所致凋亡的能力，相反, CHOP过度表达的细胞对内质网应激所致凋亡更敏感。EOR激活的靶因子NF-kB有对抗CHOP的作用，有助于细胞存活，因此可以将CHOP作为标记蛋白研究内质网应激效应发生时细胞凋亡情况。

### **2.2.2** 内质网应激效应

诱导内质网的应激蛋白表达是UPR 的主要效应之一, 这些蛋白包括：内质网分子伴侣，例如GRP78、GRP94、ERp29 ( endoplasmic ret iculum protein 29 kD)、ERp72、calret iculin、calnex in和ORP150( oxygen-regulated protein 150 kD);与蛋白加工和Ca2+平衡相关的酶，例如蛋白二硫键异构酶( protein disulfide isomerase, PDI)、内质网Ca2+ -ATP 酶

（sarco/ endoret iculum Ca2+ ATPase, SERCA）；其它内质网蛋白，例如血红素加氧酶-1( heme ox ygenase-1, HO-1)、应激相关的内质网蛋白1( stress associated endoplasmicret iculum protein 1, SERP1)、Herp等。除内质网蛋白外，内质网应激诱导的蛋白还有胞质蛋白和核蛋白等。上述分子伴侣、PDI和HO-1等被诱导表达具有促进错叠与未折叠蛋白恢复正常构象、维持内质网和胞质Ca2+平衡并维持内质网内Ca2+ 依赖性蛋白修饰反应、对抗氧化应激等效应，有助于减轻内质网应激、保护细胞。通过化学诱导剂或转基因使GRP78、GRP94等分子伴侣高表达可减轻甚至取消内质网应激、促进细胞存活，也就是说内质网应激效应伴随着GRP78和GRP94的变化，可根据这两种蛋白的表达变化研究内质网应激效应。

过强的内质网应激诱导细胞凋亡，内质网既含有促进凋亡的因子如caspase-12、

CHOP/GADD153、Cnx1，也含有抑制因子如Bax inhibitorI、Bap31、GRP78、PDI、ORP150。内质网应激过强时，促凋亡机制占主导地位，能够独立地诱导细胞凋亡，主要机制包括：

（1）激活caspase-12: caspase家族成员caspase-8/ -9/ -3/ -7等，这些因子是死亡受体、线粒体损伤通路致细胞凋亡的重要介质，位于内质网胞浆面的caspase-12则是内质网应激致凋亡的特异性介质[5]， 并且，caspase-12的激活使内质网应激能够独立地诱导凋亡，而不依赖于其它通路[6]。caspase-12的激活是由于内质网应激使胞质caspase-7转位至内质网表面，caspas-7酶切caspas-12所致。胞质Ca2+ 浓度升高使calpain激活并转位至内质网表面，也参与激活caspase-12. GRP78可抑制caspase-12 所致凋亡, GRP78被UPR诱导表达并发生重新分布，在胞质中形成亚群并充当内质网膜蛋白，可与caspase-7 和caspase-12 形成复合物，阻止caspase-12激活并抑制其从内质网释放( Rao. 2002)；（2）诱导CHOP表达：CHOP( C/ EBPhomology protein)属于C/ EBP 转录因子家族，常与该家族的其它成员形成二聚体，其基因含有ERSE，可被内质网应激诱导表达继而促进凋亡，机制包括下调Bcl2表达、耗竭谷胱甘肽、促进反应性氧族产生等( McCullough. 2001). CHOP基因敲除可增强细胞抗内质网应激所致凋亡的能力，相反, CHOP过度表达的细胞对内质网应激所致凋亡更敏感。EOR激活的靶因子NF-kB有对抗CHOP 的作用，有助于细胞存活；（3）激活线粒体介导的凋亡通路：酪氨酸激酶c-Ab1是内质网激活线粒体凋亡通路的信号分子。C-Ab1不仅存在于胞核和胞质，还有20%以上存在于内质网( Ito. 2001), 内质网应激可引起其中的c-Ab1转位至线粒体，继而促进线粒体释放促凋亡因子细胞色素c，线粒体与内质网中的Bcl-2则抑制其释放；（4）其它机制：例如，活化的Ire1 在适应子蛋白TRAF2( TNF 受体激活因子) 协助下激活JNK，后者是与细胞增殖、分化以及应激诱导的凋亡等多种过程相关的信号转导蛋白，在一定条件下诱导凋亡。可以将CHOP作为标记蛋白研究内质网应激效应发生时细胞凋亡情况。

## **2.3** 胰岛素抵抗

胰岛素抵抗是正常剂量的胰岛素产生低于正常生物学效应的一种状态，指单位浓度的胰岛素其细胞效应减弱，即组织对胰岛素的敏感性下降，代偿性引起胰岛β细胞分泌胰岛素增加， 从而产生高胰岛素血症。其实质为胰岛素介导的细胞糖代谢能力的降低。

在胰岛素抵抗初期，机体通过代偿性胰岛素分泌增多可以维持血糖在正常水平，随着胰腺β细胞功能减退，当不能再产生足够的胰岛素以增强胰岛素敏感性时，葡萄糖稳态遭到破坏，就会出现葡萄糖耐量减低，以致II型糖尿病的发生。发生胰岛素抵抗的主要部位是依赖胰岛素的葡萄糖利用器官， 如骨骼肌、肝脏、脂肪组织。

胰岛素抵抗是一个复杂的代谢紊乱，不是由单一病因引起。异位脂质代谢产物的积累，激活未折叠蛋白反应（UPR）的途径，和先天免疫缺陷都与一导读抵抗的发病机制有关。这些途径也紧密相连脂肪酸的摄取，脂肪生成的变化和能量消耗，可能会影响异位脂质沉积。最终，这些细胞变化可能会收敛到促进特定的脂质代谢产物的积累（甘油二酯和/或神经酰胺）在肝和骨骼肌中，一个共同的最终通路，导致受损的胰岛素信号和胰岛素抵抗。

## **2.4** **IL-15**与胰岛素抵抗

IL-15促进骨骼肌葡萄糖的摄入，Busquets等[7]在体研究发现，注射单次剂量IL-15

（100mg /kg体重）后，葡萄糖摄入增加；大鼠离体伸趾长肌进行IL-15孵育后发现，骨骼肌葡萄糖的摄入提高；同样，在离体培养的C2C12细胞，IL-15促进葡萄糖的摄入与GLUT-4

mRNA表达增加相关，提示IL-15对骨骼肌胰岛素敏感性的改善有显著的作用。此外还有研究表明IL-15使葡萄糖代谢速率加快，提示IL-15不仅提高骨骼肌对葡萄糖的摄入，同时还促进葡萄糖的氧化利用。IL-15促进骨骼肌脂肪的氧化，给大鼠持续注射IL-15( 100μg

/kg体重）后发现，骨骼肌脂质氧化作用显著增强，在对伸趾长肌进行IL-15孵育后，脂肪酸转运进入线粒体的速率显著加快，脂肪酸氧化率升高[8]。IL-15有可能是通过调节骨骼肌、脂肪组织等胰岛素作用的靶器官的糖、脂代谢，从而间接改善机体胰岛素抵抗。

## **2.5** 内质网应激与胰岛素抵抗

### **2.5.1** 内质网应激与胰岛素抵抗机制

目前研究发现，ERS在II型糖尿病的胰岛β细胞功能受损及外周胰岛素抵抗中占据着重要地位[9]。体外实验表明，ERS 可引起包括肝脏、肌肉和脂肪等外周组织的胰岛素抵抗。Kaneto等[10] 发现ERS能激活肌醇需求激酶-1( IRE-1)，继而激活c- jun氨基末端激酶( c- junNH 2terminal k-inase, JNK)，引起胰岛素受体底物异位的磷酸化，影响胰岛素信号的传导，进而引起IR. IRE-1、JNK信号在II型糖尿病患者肝脏胰岛素抵抗中发挥了重要作用。Ozcan等[11]利用衣霉素诱导肝细胞ERS，胰岛素刺激的Akt(蛋白激酶B)磷酸化和IRS- 1酪氨酸磷酸化下降，而IRS- 1丝氨酸的磷酸化增强。胰岛素受体及其下游IRS的丝

氨酸磷酸化阻止了胰岛素信号的传导，从而降低了胰岛素在外周组织的敏感性，导致胰岛素抵抗[12]。而用JNK抑制剂SP600125进行干预后，可显著改善糖尿病小鼠的IR和对葡萄糖的耐受性。另发现IRE- 1A基因敲除的成纤维细胞在诱导ERS时，JNK活性未有显著增强，而且胰岛素刺激的IRS- 1酪氨酸的磷酸化显著增强。这些研究结果表明ERS诱导IR可能是通过激活IRE- 1A- JNK信号系统，减弱Akt的磷酸化，促进IRS- 1丝氨酸的磷酸化，影响胰岛素信号传导，引起IR。

### **2.5.2** 内质网应激与骨骼肌胰岛素抵抗

肌肉是外周葡萄糖利用的主要场所，其中骨骼肌对葡萄糖利用依赖于胞膜上的运载蛋白，葡萄糖转运蛋白4( GLUT-4)是主要的葡萄糖运载体，其所介导的葡萄糖转运是骨骼肌糖代谢的主要限速步骤，因此GLUT-4对于全身血糖内稳态的调控具有重要意义。ATF6为内质网上II型跨膜蛋白，正常状态下与Bip形成复合物。应激状态下，ATF6与Bip解离，激活ATF6。活化的ATF6增多诱发保护性的UPR，改善ERS 的胰岛素信号通路，提高胰岛素的敏感性[13]。Raciti等[14]研究证实通过ATF6的增多对葡糖胺诱导的骨骼肌细胞GLUT-4表达的抑制，葡糖胺诱导的ERS将引起大鼠骨骼肌胰岛素抵抗、损害GLUT-4的产出和胰岛素诱导的葡萄糖摄取。在链脲霉素所致糖尿病大鼠的骨骼肌中，胰岛素刺激下2-脱氧葡萄糖的摄取及葡萄糖氧化显著低于正常对照组，并且胰岛素引发的Akt /PKB磷酸化及GLUT-4的转位严重受阻，提示高血糖损及胰岛素信号由PI3K到Akt /PBK之间的传递，为高血糖诱导骨骼肌产生胰岛素抵抗的重要原因。研究发现饱和游离脂肪酸( FFA)诱导骨骼肌中神经酰胺和二酰甘油的蓄积，抑制胰岛素引发的Akt /PKB磷酸化，干扰胰岛素信号转导和GLUT-4转位，特别是肌肉脂肪堆积抑制鞘磷脂酶的活性和增加肌肉鞘磷脂浓度，进一步增加骨骼肌胰岛素抵抗[15]。

先前的研究表明，内质网应激是参与胰岛素抵抗产生的发病机制。在体外孵育的骨骼肌组织，内质网应激的发生伴随着GRP78、GRP94以及CHOP蛋白及Mrna的过表达；同样，在肥胖大鼠的骨骼肌中，GRP78、GRP94水平在胰岛素抵抗水平下也是增加的。此外，ERS广泛存在于其他组织的病理过程，如动脉粥样硬化，缺血性心脏疾病，心肌病，心脏衰竭等。在这些流程，ERS可导致细胞损伤和凋亡，而抑制或重塑的ERS反应途径可能提供保护骨骼肌。IL-15是一种多功能多肽参与多种组织的保护作用。然而，IL-15在内质网应激和胰岛素抵抗之间的关系还没有调查。

# **3** 材料与方法

## **3.1** 实验动物与分组

### **3.1.1** 实验动物

选用五周龄雄性Sprague-Dawley(SD)大鼠，购自北京维通利华实验动物技术有限公司。按照中华人民共和国卫生部实验动物管理规定执行(55 号文件，2001)，常规条件（温度

（24±2）℃，湿度60%左右，24 h通风，自然照明）饲养，实验前12小时禁食，自由饮水。

### **3.1.2** 实验分组

本实验分为比目鱼肌体外组织孵育组和腓肠肌体外组织孵育组，并分别将比目鱼肌、腓肠肌按照内质网应激不同诱导机/制分别给与10ug/mL Tm和2mmol/L DTT刺激，IL-15浓度根据预实验验证后分别给予10ng/ml和100ng/ml两种剂量，具体分组如下表：

表1 比目鱼肌分组

| 比目鱼肌对照组 | 比目鱼肌  +Tm | 比目鱼肌  +Tm+10ng/ml IL-15 | 比目鱼肌  +Tm+100ng/ml IL-15 | 比目鱼肌+DTT | 比目鱼肌  +DTT+10ng/ml IL-15 | 比目鱼肌  +DTT+100ng/ml IL-15 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 复孔 1 | 复孔 1 | 复孔 1 | 复孔 1 | 复孔 1 | 复孔 1 | 复孔 1 |
| 复孔 2 | 复孔 2 | 复孔 2 | 复孔 2 | 复孔 2 | 复孔 2 | 复孔 2 |
| 复孔 3 | 复孔 3 | 复孔 3 | 复孔 3 | 复孔 3 | 复孔 3 | 复孔 3 |

表2 腓肠肌分组

| 腓肠肌对照组 | 腓肠肌  +Tm | 腓肠肌  +Tm+10ng/ml IL-15 | 腓肠肌  +Tm+100ng/ml IL-15 | 腓肠肌  +DTT | 腓肠肌  +DTT+10ng/ml IL-15 | 腓肠肌  +DTT+100ng/ml IL-15 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 复孔 1 | 复孔 1 | 复孔 1 | 复孔 1 | 复孔 1 | 复孔 1 | 复孔 1 |
| 复孔 2 | 复孔 2 | 复孔 2 | 复孔 2 | 复孔 2 | 复孔 2 | 复孔 2 |
| 复孔 3 | 复孔 3 | 复孔 3 | 复孔 3 | 复孔 3 | 复孔 3 | 复孔 3 |

## **3.2** 主要试剂

### **3.2.1** 抗体

**一抗** 兔抗GRP78单克隆抗体购自英国Abcam公司、兔抗GRP94单克隆抗体购自英国

Abcam公司、兔抗CHOP单克隆抗体购自英国Abcam公司、鼠抗β-actin(sc-1616)多克隆抗体购自美国SantaCruz公司。

**二抗** HRP偶联二抗均购自美国SantaCruz公司。

### **3.2.2** 药物

重组大鼠IL-15: 美国Peprotech公司

衣霉素（Tm）：美国Sigma-Aldrich公司

二硫苏糖醇（DTT）：美国Sigma-Aldrich公司氨基甲酸乙酯（乌拉坦）：北京笃信精细制剂厂

### **3.2.3** **Westernblot**相关试剂

考马斯亮蓝：美国Sigma-Aldrich公司牛血清白蛋白：美国Sigma-Aldrich公司二硫苏糖醇：美国Amresco公司

二巯基乙醇：Merk公司甘氨酸：美国Promega公司

Tris-碱：美国Promega公司

N, N, N', N'-四甲基乙二胺(N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine, TEMED): 美国

Sigma-Aldrich公司

硝酸纤维素膜：北京索莱宝科技有限公司

ECL化学发光试剂盒：北京普利莱技术公司

X光胶片：美国Kodak公司

### **3.2.4** 其他试剂

氯化钠、碳酸氢钠、氯化镁、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、葡萄糖、无水乙醇和甲醇等：北京北化精细化学品有限责任公司。

## **3.3** 主要仪器

Ultra-TuraxT25组织匀浆器：西德公司分析天平：AF100型美国And公司

电泳仪及蛋白质电泳及转膜系统：北京市六一仪器厂纯水系统：法国Millipore公司

低温离心机：CPKR型美国Beckman公司；15R型德国Heraeus公司微量高速离心机：Biofuge15R Heraeus公司

低温高速离心机：J2-HS，CPKR美国Beckman公司酶标记数仪：550型美国BioRed公司

沸水浴槽：北京市医疗设备厂

电热鼓风干燥箱(CS101-1A)：重庆实验设备厂

4℃/-20℃低温冰箱：德国Siemens公司

## **3.4** 常用溶液配制

0.9％生理盐水溶液：

（1）NaCl 9g（2）溶于1000ml蒸馏水中，配成0.9％的溶液。

20%乌拉坦溶液：

（1）氨基甲酸乙酯20g（2）溶于100ml生理盐水中磷酸盐缓冲液(0.1mol/LPBS)：

（1）NaCl 8.0g(2) KCl 0.2g(3) Na2HPO4·12 H2O 2.896g(4) KH2PO4 0.24g（5）补蒸馏水定容至1000ml,调pH值为7.4.

组织裂解缓冲液：

（1）NaCl 150mmol/L(2) Tris·Cl(pH7.4) 100mmol/L (3) EDTA 1mmol/L(4) PMSF 1mmol/L(5) Aprotinin 10ug/ml(6) PepstatinA 10ug/ml(7) TritonX-100 1%（8）检测磷酸化蛋白时，裂解液中需再加入磷酸酶抑制剂：终浓度为0.01mol/L焦磷酸钠，

0.05mol/L氟化钠和1mmol/L氧钒酸钠。

30%丙烯酰胺储存液：

（1）丙烯酰胺29g（2）N，N–亚甲双丙烯酰胺1g（3）加去离子水定容至100ml，滤纸过滤后，4℃避光保存。

1.0 mol/LTris·Cl(pH6.8) ：

（1）Tris-碱12.11g（2）去离子水定容至100ml，以HCl调pH值至6.8.

1.5 mol/LTris·Cl(pH8.8) ：

（1）Tris-碱18.16g（2）去离子水定容至100ml，以HCl调pH值至8.8.10% SDS：

（1）SDS 10g（2）去离子水定容至100ml，37℃水浴、震荡至澄清。

10%过硫酸铵：

（1）过硫酸铵0.1g（2）加去离子水至1ml，-20℃保存

表 3 不连续 SDS聚丙烯酰胺凝胶（SDS-PAGE）

|  | 12%分离胶  （10ml） | 10%分离胶  8(ml) | 5%浓缩胶  4(ml) |
| --- | --- | --- | --- |
| 去离子水 | 3.3ml | 3.2ml | 2.72ml |
| 30%丙烯酰胺储存液 | 4.0ml | 2.67ml | 0.66ml |
| 1.5Mol/L Tris·Cl(PH8.8) | 2.5ml | 2.0ml | — |
| 1.0Mol/L Tris·Cl(PH6.8) | — | — | 0.50ml |
| 10% SDS | 0.1ml | 0.08ml | 0.04ml |
| 10%过硫酸铵 | 0.1ml | 0.08ml | 0.04ml |
| TEMED | 4.0ul | 3.2ul | 4.0ul |

Tris缓冲液(TBS)：

（1）Tris-碱6.057g(2) NaCl 8.775g（3）以HCl调pH值至7.6.

5×蛋白电泳上样缓冲液：

（1）1M Tris-HCl pH6.8 2.5ml(2) SDS 1g（3）甘氨酸5ml（4）去离子水1ml(5) 75℃2-3h缓慢震荡至完全溶解（6）β-ME 250μl（7）溴酚蓝5mg（8）补去离子水至

10ml，室温保存。

10×TBS ：

（1）2MTris-HCl pH7.4 50ml(2) NaCl 48.83g（3）加蒸馏水至500ml. Tris-甘氨酸电泳缓冲液：

（1）Tris-碱25mmol/L（2）甘氨酸250mmol/L(3) SDS 0.1%

电转缓冲液：

（1）甲醇150ml(2) Tris-碱3.03g（3）甘氨酸14.4g（4）蒸馏水定容至1000ml. TBST：

（1）TBS 1000ml（2）吐温-20 1ml

封闭液（5%脱脂奶粉）：

（1）TBST 100ml（2）脱脂奶粉5g

## **3.5**实验方法

### **3.5.1** 骨骼肌组织离体孵育

（1）SD大鼠腹腔注射20%乌拉坦（1.0g/kg=5.0ml/kg），麻醉后迅速切取比目鱼肌、腓肠肌；

（2）冰DMEM液中清洗；

（3）将骨骼肌移入蜡盘中（蜡盘置于冰上并加入适量DMEM液），用刀片顺肌纤维方向切成肌条，每条25-30mg；

（4）将骨骼肌转移到24孔板（每孔预先滴蜡，加入1ml含有2% BSA的DMEM液），分别用大头针将其固定，使孵育时骨骼肌有一定轻微的张力（与静息时的长度相比），这样能够使骨骼肌在3h的孵育过程中保持ATP和磷酸肌酸的浓度正常；

（5）孵育过程中持续充入混合气体（95% O2, 5% CO2），预孵育30min后，分别加入10ng/ml

和100ng/ml IL-15;

（6）30min后按分组分别加入10ug/mL Tm和10ul 2mmol/L DTT；

表4 实验分组

| 比目鱼肌/腓肠肌 | 比目鱼肌 / 腓肠肌  +TM/DTT | 比 目 鱼 肌 / 腓 肠 肌  +Tm/DTT+10ng/ml IL-15 | 比目鱼肌 / 腓肠肌  +Tm/DTT+100ng/ml IL-15 |
| --- | --- | --- | --- |
| 复孔 1 | 复孔 1 | 复孔 1 | 复孔 1 |
| 复孔 2 | 复孔 2 | 复孔 2 | 复孔 2 |
| 复孔 3 | 复孔 3 | 复孔 3 | 复孔 3 |

（7）将24孔板置于水浴摇床中，45次/min震荡，并加热维持37℃恒温；

（8）3小时后，将24孔板放置于冰上终止反应，将肌条冻存。

### **3.5.2** 蛋白含量测定

#### **3.5.2.1** 测定原理

考马斯亮蓝G-250 与蛋白质可发生迅速结合，随后引起染料最大光吸收的改变，在

595nm处光吸收达最大，且结合物的颜色在1h左右较为稳定。同时，由于蛋白质-染料复合物具有较高的消光系数，因而大大提高了蛋白质检测的灵敏度，最低检出量可达µg水平。

#### **3.5.2.2** 试剂配制

0.01%考马斯亮蓝溶液：称取考马斯亮蓝G-250100mg，溶于50ml95%乙醇中，加入

100ml85%磷酸，混匀，4℃保存。临用前取15ml加水至100ml，粗滤纸过滤后使用。

#### **3.5.2.3** 蛋白标准曲线制作

用牛血清白蛋白配制1mg/ml的蛋白标准液，以蒸馏水稀释成800、400、200、100µg/mL

标准应用液。取组织匀浆裂解上清液，20倍或5倍稀释后按下表操作：

表5 蛋白定量上样量

| BSA(mg/ml) | 0 | 10 | 20 | 40 | 80 | 100 | 测定管 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 标准应用液（ul） | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |  |
| 样品（ul） |  |  |  |  |  |  | 10 |
| 考马斯亮蓝（ul） | 350 | 350 | 350 | 350 | 350 | 350 | 350 |

混匀，在595nm下读出OD值。以蛋白浓度为横坐标，OD值为纵坐标，绘制标准曲线。

#### **3.5.2.4** 样品蛋白含量测定

吸取待测样品稀释液10μl，加入350µl考马斯亮蓝溶液，混匀后静置10min，在595nm处，以空白管调零，读取各管OD值。所得OD值用于在标准曲线公式上求得相应的蛋白含量，样品蛋白含量以μg/μl表示。

### **3.5.3** 蛋白印迹**(Westernblot)**

#### **3.5.3.1** 样品制备—组织蛋白提取

实验完成后迅速取出待检测组织约20mg，加200ul裂解缓冲液，冰浴条件下剪碎组织，

Ultra-TurexT 25匀浆器2min×3次匀浆，4℃12000rpm离心10min，取上清进行蛋白定量，

1/4体积加入5×蛋白上样缓冲液，于100℃煮沸15min，冰上放置后储存在-20℃或-70℃冰箱保存。

#### **3.5.3.2 SDS**聚丙烯酰胺凝胶的配制和电泳**(**参考《分子克隆实验指南》**)**

a）将电泳玻璃板洗净，用蒸馏水冲洗三次，晾干。

b）将两块玻璃板用夹子固定，侧面放好相应厚度的封边条。

c）配制10％或12%的分离胶溶液7ml(一块板用量)。

d）迅速灌注分离胶溶液，然后小心地在分离胶溶液上覆盖一层去离子水，将凝胶垂直放置于室温下。

e）待分离胶聚合完全后，倾出覆盖层的液体，用滤纸尽可能排去凝胶上的液体，但不能接触凝胶。

f）配制5%的浓缩胶溶液3ml(一块板用量)。

g）灌注浓缩胶后，立即插入相应厚度的梳子，将凝胶垂直放置于室温下。

h）待浓缩胶聚合完全后，小心将梳子拔出。

i）将灌注有凝胶的玻璃板固定于电泳装置上，内、外槽均加入Tris-甘氨酸电泳缓冲液。

j）蛋白样品于100℃煮沸5min，各样品分别取等量蛋白，按预定的顺序加样。

k）连接上电源，电压设定为分离胶6-7V/cm，浓缩胶4-5V/cm。根据目的条带的位置决定终止电泳时间。

#### **3.5.3.3** 转膜

a）准备：按所需大小分别剪好硝酸纤维素膜和滤纸，将硝酸纤维素膜平铺于电转液水面自然吸水后再完全地浸入液体中以排除气泡，将滤纸也浸入电转液中，电转槽中加入适量转移液，浸泡海绵。

b）将胶卸下，保留目的片段胶，按顺序铺上硝酸纤维素膜与滤纸。注意逐出气泡，每层之间不能留有气泡。

c）将滤纸、膜和胶按顺序放在转移夹中，夹好之后将转移夹放入转移槽中，注意将膜面靠近正极，胶面靠近负极。

d）于冰水混合的环境中以200mA稳流进行转移，根据目的条带分子量大小确定转移时间。

#### **3.5.3.4** 封闭

将硝酸纤维素膜从电转槽中取出，用TBST稍加漂洗后浸没于5%脱脂奶粉或5%BSA封闭液中缓慢摇荡1h。必要时可先用丽春红染色观察蛋白条带，再用TBST将丽春红洗脱后封闭。

#### **3.5.3.5** 抗体杂交孵育

a）孵育一抗：用TBST稀释一抗至工作浓度滴加于备好的封口膜中，将硝酸纤维素膜从封闭液中取出，滤纸稍吸干，有蛋白面朝下孵在一抗上，注意不要留有气泡，静置于4℃冰箱过夜。

b）洗膜：一抗孵育结束后，室温下用TBST在摇床上以60rpm洗膜三次，每次5min。

c）孵育二抗：根据一抗选择适当种属的HRP偶连二抗，用封闭液按相应比例稀释，室温孵育一小时。二抗孵育结束后，用TBST洗膜三次，每次5min。

#### **3.5.3.6** 发光

用镊子将硝酸纤维素膜从TBST中取出，滤纸贴角吸干，有蛋白面朝下贴覆于发光液上，孵育2min后置于保鲜膜内并固定在片盒中。暗室中根据条带的亮度适当曝光，显影

1min，定影至胶片感蓝。清水冲净晾干后标定蛋白Marker，进行扫描分析。

## **3.6** 统计学方法

计量资料以均数±标准误(mean±SEM)表示，两组数据之间的差异用Student`s t test检验，多于两组之间的差异采用单因素方差分析One-way ANOVA检验。*P*<0.05认为有统计学意义；*P*<0.01认为有显著统计学意义。

# **4** 实验结果

## **4.1** **IL-15**能够抑制**Tm**诱导的骨骼肌内质网应激

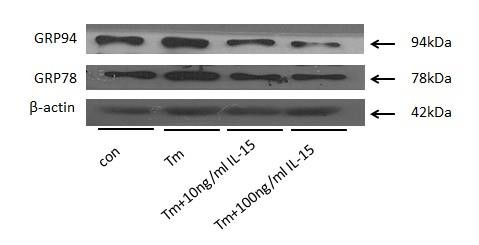
### **4.1.1** **IL-15**抑制**Tm**诱导的比目鱼肌内质网应激

Western blot结果显示，与对照组相比，比目鱼肌在Tm诱导下内质网应激标记蛋白

GRP78、GRP94明显升高（*P*<0.05或*P*<0.01），以上结果提示在Tm诱导下比目鱼肌形成内质网应激反应；外源性给予两种浓度IL-15后，比目鱼肌内质网应激标记蛋白GRP78、

GRP94表达均降低，在给与100ng/ml IL-15孵育的比目鱼肌与Tm刺激组有极显著差异

（*P*<0.001）。以上结果提示外源性给予IL-15能够抵抗比目鱼肌内质网应激的发生。



A

B C



图1 IL-15抑制Tm诱导的比目鱼肌内质网应激标记蛋白GRP78、GRP94表达(A) Western blot测定比目鱼肌GRP78的蛋白表达变化；(B)比目鱼肌GRP78的蛋白表达统计；(C)比目鱼肌GRP94的蛋白表达统计。Data are mean±SEM, n=3, \* *P*<0.05 vs Con. \*\**P*<0.01 vs Con. \*\*\**P*<0.001 vs Tm.

### **4.1.2** **IL-15**抑制**Tm**诱导的白腓肠肌内质网应激

Western blot结果显示，与对照组相比，白腓肠肌在Tm诱导下内质网应激标记蛋白

GRP78、GRP94明显升高（*P*<0.01或*P*<0.05），以上结果提示在Tm诱导下白腓肠肌形成内质网应激反应；外源性给予两种浓度IL-15后，白腓肠肌内质网应激标记蛋白GRP78、

GRP94表达均降低，在给与100ng/ml IL-15孵育的比目鱼肌与Tm刺激组有极显著差异

（*P*<0.001）.以上结果提示外源性给予IL-15能够抵抗白腓肠肌内质网应激的发生。



A

B C

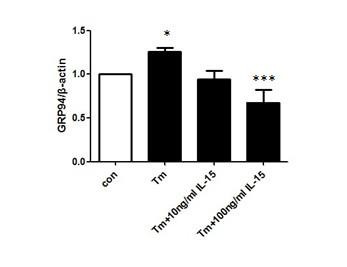
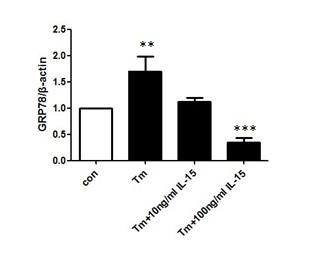


图2 IL-15抑制Tm诱导的白腓肠肌内质网应激标记蛋白GRP78、GRP94表达(A) Western blot测定白腓肠肌GRP78的蛋白表达变化；(B)白腓肠肌GRP78的蛋白表达统计; (C)白腓肠肌GRP94的蛋白表达统计。Data are mean±SEM, n=3, \* *P*<0.05 vs Con. \*\**P*<0.01 vs Con. \*\*\**P*<0.001 vs Tm.

## **4.2** **IL-15**能够抑制**DTT**诱导的骨骼肌内质网应激

### **4.2.1** **IL-15**抑制**DTT**诱导比目鱼肌内质网应激

Western blot结果显示，与对照组相比，比目鱼肌在DTT诱导下内质网应激标记蛋白

GRP78、GRP94明显升高（*P*<0.05），以上结果提示在DTT诱导下比目鱼肌形成内质网应激反应；外源性给予两种浓度IL-15后，比目鱼肌内质网应激标记蛋白GRP78、GRP94表达均降低，在给与100ng/ml IL-15孵育的比目鱼肌与DTT刺激组有显著差异（*P*<0.01或*P*<0.001）.以上结果提示外源性给予IL-15能够抵抗比目鱼肌内质网应激的发生。

A



B C



图3 IL-15抑制DTT诱导的比目鱼肌内质网应激标记蛋白GRP78、GRP94表达(A) Western blot测定比目鱼肌GRP78的蛋白表达变化；(B)比目鱼肌GRP78的蛋白表达统计；(C)比目鱼肌GRP94的蛋白表达统计。Data are mean±SEM, n=3, \* *P*<0.05 vs Con. \*\**P*<0.01 vs DTT. \*\*\**P*<0.001 vs DTT.

### **4.2.2** **IL-15**抑制**DTT**诱导的白腓肠肌内质网应激

Western blot结果显示，与对照组相比，白腓肠肌在DTT诱导下内质网应激标记蛋白

GRP78、GRP94明显升高（*P*<0.05或*P*<0.001），以上结果提示在DTT诱导下白腓肠肌形成内质网应激反应；外源性给予两种浓度IL-15后，白腓肠肌内质网应激标记蛋白GRP78、

GRP94表达均降低，在给与100ng/ml IL-15孵育的白腓肠肌与DTT刺激组有显著差异

（*P*<0.001）.以上结果提示外源性给予IL-15能够抵抗白腓肠肌内质网应激的发生。

A



B C



图4 IL-15抑制DTT诱导的白腓肠肌内质网应激标记蛋白GRP78、GRP94表达(A) Western blot测定白腓肠肌GRP78的蛋白表达变化；(B)白腓肠肌GRP78的蛋白表达统计; (C)白腓肠肌GRP94的蛋白表达统计。Data are mean±SEM, n=3, \* *P*<0.05 vs Con. ###*P*<0.001 vs Con. \*\*\**P*<0.001 vs DTT.

## **4.3** **IL-15**能够抑制**Tm/DTT**诱导下骨骼肌的**CHOP**蛋白表达

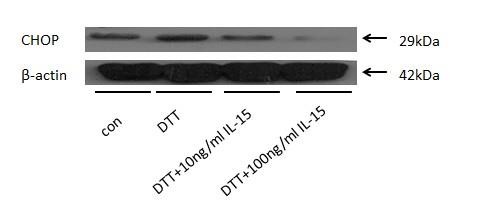
Western blot结果显示，与对照组相比，骨骼肌在Tm和DTT诱导形成内质网应激下游CHOP通路细胞凋亡标记蛋白CHOP明显升高（*P*<0.05或*P*<0.001），以上结果提示在

Tm和DTT诱导的骨骼肌发生细胞凋亡；外源性给予两种浓度IL-15后，骨骼肌中CHOP蛋白的表达均降低，在给与100ng/ml IL-15孵育的骨骼肌与给予Tm或者DTT刺激组有极显著差异（*P*<0.001）.以上结果提示外源性给予IL-15能够抵抗骨骼肌内质网应激下游细胞凋亡的发生。

A B



C D



E F

G H



图5 IL-15能够抑制在Tm/DTT诱导下骨骼肌的细胞凋亡蛋白CHOP的表达(A and B) Western blot测定比目鱼肌CHOP的蛋白表达变化；(C and D)比目鱼肌CHOP的蛋白表达统计；(E and F) Western blot测白腓肠肌CHOP的蛋白表达变化；(G and H)白腓肠肌CHOP的蛋白表达统计；Data are mean±SEM, n=3 ，

\**P*<0.05 \*\**P*<0.01 vs Con. \*\*\**P*<0.001 vs Tm. ###*P*<0.001 vs DTT。

# **5** 讨论

迄今为止积累的证据表明，ER与骨骼肌在运动过程中的适应机制和饮食习惯的改变有关。然而，这种现象变得病理失控的情况下，内质网应激导致串扰与线粒体和自噬体的形成，发起一个激活炎症和细胞死亡通路（自噬，坏死和凋亡）骨骼肌。这些肌纤维损伤的途径目前仍不清楚。通过一些方法，我们在这些途径给予基因或药物阻断阐明它们的相对肌肉疾病和疾病的过程中的作用帮助我们设计治疗策略，以减少纤维损伤改善肌肉的功能。

通过啮齿类动物模型研究理解胰岛素的发病机制中的潜在的细胞机制性对人类的作用有着极其重大的意义，通过一定技术手段我们可以掌握未来治疗此类疾病的药物或者某种治疗方法，达到造福人类的目的。

本实验在TM/DTT诱导的离体大鼠骨骼肌组织建立ERS模型上，外源性给予两种浓度IL-15孵育，western blot检测内质网应激以及CHOP通路相关蛋白的表达，发现IL-15能够抑制GRP78、GRP94以及CHOP蛋白的表达，提示骨骼肌外源性给予IL-15能够抑制其内质网应激的发生。

IL-15是近年发现的一种新的肌肉因子，主要在骨骼肌中表达、合成和分泌[16-18]。骨骼肌IL-15可通过旁/自分泌的方式作用于骨骼肌自身的IL-15受体，促进骨骼肌蛋白合成、抑制骨骼肌蛋白降解、促进葡萄糖摄入和脂肪酸氧化[19-22]。目前已有实验证明，IL-15参与了骨骼肌胰岛素抵抗的发生，那么IL-15对胰岛素抵抗的作用机制是通过何种途径进行的目前尚不清楚。IL-15促进骨骼肌葡萄糖的摄入，Busquets等[7]在体研究发现，注射单次剂量IL-15 ( 100mg /kg体重)后，葡萄糖摄入增加；大鼠离体伸趾长肌进行IL-15孵育后发现，骨骼肌葡萄糖的摄入提高；同样，在离体培养的C2C12细胞，IL-15 促进葡萄糖的摄入与GLUT-4 mRNA表达增加相关，提示IL-15对骨骼肌胰岛素敏感性的改善有显著的作用。此外还有研究表明IL-15使葡萄糖代谢速率加快，提示IL-15不仅提高骨骼肌对葡萄糖的摄入，同时还促进葡萄糖的氧化利用。IL-15促进骨骼肌脂肪的氧化，给大鼠持续注射

IL-15( 100μg /kg体重)后发现，骨骼肌脂质氧化作用显著增强，在对伸趾长肌进行IL-15孵育后，脂肪酸转运进入线粒体的速率显著加快，脂肪酸氧化率升高[8]。IL-15有可能是通过调节骨骼肌、脂肪组织等胰岛素作用的靶器官的糖、脂代谢，从而间接改善机体胰岛素抵抗。目前研究发现，ERS在II型糖尿病的胰岛β细胞功能受损及外周胰岛素抵抗中占据着重要地位[9] 。体外实验表明，ERS 可引起包括肝脏、肌肉和脂肪等外周组织的胰岛素抵抗。Kaneto等[10]发现ERS能激活肌醇需求激酶-1( IRE-1)，继而激活c- jun氨基末端激酶，引起胰岛素受体底物异位的磷酸化，影响胰岛素信号的传导，进而引起IR. IRE-1、JNK 信号在II型糖尿病患者肝脏胰岛素抵抗中发挥了重要作用。Ozcan 等[11] 利用衣霉素

诱导肝细胞ERS，胰岛素刺激的Akt(蛋白激酶B)磷酸化和IRS- 1酪氨酸磷酸化下降，而IRS- 1丝氨酸的磷酸化增强。胰岛素受体及其下游IRS的丝氨酸磷酸化阻止了胰岛素信号的传导，从而降低了胰岛素在外周组织的敏感性，导致胰岛素抵抗[12]。而用JNK抑制剂SP600125进行干预后，可显著改善糖尿病小鼠的IR和对葡萄糖的耐受性。另发现IRE- 1A基因敲除的成纤维细胞在诱导ERS时，JNK活性未有显著增强，而且胰岛素刺激的IRS- 1酪氨酸的磷酸化显著增强。这些研究结果表明ERS诱导IR可能是通过激活IRE- 1A- JNK信号系统，减弱Akt的磷酸化，促进IRS- 1丝氨酸的磷酸化，影响胰岛素信号传导，引起IR。

本实验在骨骼肌内质网应激模型中，观察到IL-15能够降低骨骼肌因Tm/DTT诱导形成内质网应激相关蛋白的表达，从而抵抗内质网应激的发生。目前研究表明，Tm/DTT诱导的ERS将引起大鼠骨骼肌胰岛素抵抗，以及细胞凋亡的发生。以上结论提示，IL-15能够抵抗内质网应激的发生，从而能够改善胰岛素抵抗的发生。

# **6** 结论

1. 给予离体骨骼肌组织外源性IL-15孵育后，能够抑制Tm诱导的内质网应激的发生，从而改善骨骼肌胰岛素抵抗。

2. 给予离体骨骼肌组织外源性IL-15孵育后，能够抑制DTT诱导的内质网应激的发生，从而改善骨骼肌胰岛素抵抗。

总之，IL-15能够降低Tm、DTT诱导的内质网应激相关蛋白GRP78、GRP94以及CHOP的表达，我们的研究结果提示IL-15可能是通过抵制内质网应激改善胰岛素抵抗来实现相关疾病的控制。因此，骨骼肌IL-15可能是通过抵制内质网应激来改善胰岛素抵抗的调节机制之一。

参考文献

[1] Almendro V, Busquets S, Ametller E, et al． Effects of interleukin-15 on lipid oxidation:

[2] Busquets S, Figueras M, Almendro V, et al. Interleukin-15 increases glucose uptake in skeletal muscle. An antidiabetogenic effect of the cytokine[J]. Biochim Biophys Acta, 2006, 760(11): 613-617.

[3] Di SA, Calarota SA, Vidali F, et al． Role of IL-15 in immune-mediated and infectiousdiseases[J]． Cytokine Growth Factor Rev, 2011, 22 ( 1) : 19-33．

[4] Nakag aw a T, Zhu H, Mor ishima N, et al. Caspase-12 mediates endoplasmicr eticulum specific apoptosis and cytotox icity by amyloid beta[J]. Nature, 2000, 403: 98-103.

[5] Pahl HL. Signal transduction from the endoplasmic reticulum to the cell nucleus[J]. Physiol Rev, 1999, 79: 683-701.

[6] Quinn LS, Strait-Bodey L, Anderson BG et al. Interleukin-15 stimulates adiponectin secretion by 3T3-L1 adipocytes: evidencefor a skeletal muscle-to-fat signaling pathway[J]. Cell Biol Int, 2005, 29: 449-57.

[7] Rafei M, Jian H, Annabi B, et a1． A GMCSF and IL-15 fusokine leads to paradoxical immunosuppression in vivo via asymmetrical JAK/STAT signaling through the IL-15 receptor complex[J]． Blood, 2007, 109 ( 5): 234-242．

[8] Rao RV, Castro Obregon S, Frankowski H, et al. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death progr am. An Apaf1 independent intr insic pathway[J]. BiolChem, 2002, 277(21): 836-842.

Disposal of an oral [( 14) C] -triolein load[J]. Biochim Biophys Acta, 2006, 761 (1): 37-42. [9]NAKATANI Y, KANETO H, KAWAMORI D, et al. Involvement of endoplasmic reticulum stress in insulin resistance and diabetes[J]. J Biol Chem, 2005, 280: 847-851.

[10] KANETO H, NAKATANI Y, KAWAMORI D, et al. Role of oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and cJunN terminal kinase in pancreatic beta cell dysfunction andinsulin resistance[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2006, 38: 782-793.

[11] OZCAN U, CAO Q, YILMAZ E, et al. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes[J]. Science, 2004, 306: 4574-4561.

[12] MUOIO D M, NEWGARD C B. Insulin resistance takes a trip through the ER[J]. Science, 2004, 306: 425-426.

[13] Ye R, Jung DY, Jun JY, et al. Grp78 heterozygosity promotes adaptive unfolded protein response and attenuates dietinduced obesity and insulin resistance[J]. Diabetes, 2010, 59: 6-16.

[14] Raciti GA, Iadicicco C, Ulianich L, et al. Glucosamine-induced endoplasmic reticulum stress affects GLUT4 expression via activating transcription factor 6 in rat and human skeletal

Muscle cells[J]. Diabetologia, 2010, 53: 955-965.

[15] Jung HL, Kang HY. Effects of endurance exercise and highfat diet on insulin resistance and ceramide contents of skeletal muscle in sprague-dawley rats[J]. Korean Diabetes, 2010, 34: 244-252.

[16] Grabstein K H, Eisenman J, Shanebeek K, et a1. Cloning of a T cell growth factor that interacts with theβ-chain of the interleukin-2 receptor [J]. Science, 1994, 264(5): 965-968.

[17] Fehniger T. A., and Caligiuri M. A. Interleukin-15: Biology and relevance to human disease [J]. Blood, 2001, 97: 14-32.

[18] Tagaya Y., R. N. Bambord, A. P. DeFilippis, and T. A. Waldmann. IL-15: A pleiotropic cytokine with diverse receptor/signaling pathways whose expression is controlled at multiple levels [J]. Immunity, 1996, 4: 329-336.

[19] S. Busquets, M. Figueras, V. Almendro, F. J. Lo´pez -Soriano, and J. M. Argile´s. Interleukin-15 increases glucose uptake in skeletal muscle: An antidiabetogenic effect of the cytokine [J]. Biochem. Biophys. Acta, 2006, 1760: 1613-1617.

[20] S. Busquets, M. T. Figueras, S. Meijsing, N. Carbo´, L. S. Quinn, V. Almendro, J. M. Argile´s, and F. J. Lo´pez -Soriano. Interleukin-15 decreases proteolysis in skeletal muscle: A direct effect [J]. Int. J. Mol. Med, 2005, 16: 471-476.

[21] Carbo´N., J. Lo´pez -Soriano, P. Costelli, S. Busquets, B. Alvarez, F. M. Baccino, L. S. Quinn, F. J. Lo´pez -Soriano, and J. M. Argile´s. Interleukin -15 antagonizes muscle protein waste in tumour-bearing rats [J]. Br. J. Cancer, 2000, 83: 526-531.

[22] L. S. Quinn, B. G. Anderson, R. H. Drivdahl, B. Alvarez, and J. M. Argile´s. Overexpression of interleukin-15 induces skeletal muscle hypertrophy in vitro: Implications for treatment of muscle wasting disorders [J]. Exp. Cell Res, 2002, 280: 55-63.

[23] Pedersen BK. Edward F. Adolph distinguished lecture: muscle as an endocrine organ: IL-6 and other myokines [J]. J Appl Physiol, 2009, 107(4): 1006-1014.

[24] Nielsen S, Pedersen BK. Skeletal muscle as an immunogenic organ [J]. Curr Opin Pharmacol, 2008, 8(3): 346-351.

[25] Rafei M, Jian H, Annabi B, et a1. A GMCSF and IL-15 fusokine leads to paradoxical immunosuppression in vivo via asymmetrical JAK/STAT signaling through the IL-15 receptor complex [J]. Blood, 2007, 109(5): 2234-2242．

[26] Almendro V, Busquets S, Ametller E et al. Effects of interleukin-15 on lipid oxidation: disposal of an oral [(14) C] -triolein load [J]. Biochim Biophys Acta, 2006,1761(1): 37-42.

[[27] Brincks EL,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Brincks%20EL%22%5BAuthor%5D) [Woodland DL](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Woodland%20DL%22%5BAuthor%5D). [Novel roles for IL-15 in T cell survival [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21173876) [F1000 Biol Rep.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%20Novel%20roles%20for%20IL-15%20in%20T%20cell%20survival.) 2010, 2: 67.

[28] Inoue S, Unsinger J, Davis CG, et al. [IL-15 prevents apoptosis, reverses innate and adaptive](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20026737)

[Immune dysfunction, and improves survival in sepsis [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20026737) J Immunol, 2010, 184(3): 1401-1409.

[29] Marzetti E, Carter CS, Wohlgemuth SE et al. Changes in IL-15 expression and death-receptor apoptotic signaling in rat gastrocnemius muscle with aging and life-long calorie restriction [J]. Mech Ageing Dev, 2009, 130(4): 272-280.

[30] Malamut G, El Machhour R, Montcuquet N, et al. [IL-15 triggers an antiapoptotic pathway in human intraepithelial lymphocytes that is a potential new target in celiac disease-associated inflammation and lymphomagenesis[J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20440074) J Clin Invest, 2010, 120(6): 2131-2143.

[31] Fuster G, Busquets S, Figueras M et al. PPARdelta mediates IL15 metabolic actions in myotubes: effects of hyperthermia [J]. Int J Mol Med, 2009, 24(1): 63-68.

[32] Busquets S, Figueras M, Almendro V et al. Interleukin-15 increases glucose uptake in skeletal muscle. An antidiabetogenic effect of the cytokine [J]. Biochim Biophys Acta, 2006, 1760(11): 1613-1617.

[33] Nielsen AR, Hojman P, Erikstrup C et al. Association between interleukin-15 and obesity: interleukin-15 as a potential regulator of fat mass[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2008, 93(11): 4486-4493.

[34] Quinn LS, Anderson BG. [Interleukin-15, IL-15 Receptor-Alpha, and Obesity: Concordance of Laboratory Animal and Human Genetic Studies [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21603270) J Obes, 2011, 2011:45-47.

[35] Gokkusu C, Aydin M, Ozkok E et al. Influences of genetic variants in interleukin-15 gene and serum interleukin-15 levels on coronary heart disease [J]. Cytokine, 2010, 49(1): 58-63.

[[36] van Es T](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22van%20Es%20T%22%5BAuthor%5D), [van Puijvelde GH,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22van%20Puijvelde%20GH%22%5BAuthor%5D) [Michon IN,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Michon%20IN%22%5BAuthor%5D) et al. [IL-15 aggravates atherosclerotic lesion development in LDL receptor deficient mice[J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21115056) Vaccine. 2011, 29(5): 976-983.

[[37] van der Meer JJ](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22van%20der%20Meer%20JJ%22%5BAuthor%5D), [de Boer OJ](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22de%20Boer%20OJ%22%5BAuthor%5D), [Teeling P](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Teeling%20P%22%5BAuthor%5D), et al. [Smooth muscle homeostasis in human atherosclerotic plaques through interleukin 15 signalling[J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21487524) Int J Clin Exp Pathol, 2011, 4(3): 287-294.

[38] Iwasaki S, Minamisawa S, Yokoyama U et al. Interleukin-15 inhibits smooth muscle cell proliferation and hyaluronan production in rat ductus arteriosus[J]. Pediatr Res, 2007, 62(4): 392-398.

[39] Cercek M, Matsumoto M, Li H et al. Autocrine role of vascular IL-15 in intimal thickening [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 339(2): 618-623.

[40] Houtkamp MA, van Der Wal AC, de Boer OJ, et al. [Interleukin-15 expression in atherosclerotic plaques: an alternative pathway for T-cell activation in atherosclerosis [J]](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11451753) ArteriosclerThrombVascBiol, 2001, 21(7): 1208-1213.

[[41] Budagian V,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Budagian%20V%22%5BAuthor%5D) [Bulanova E,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Bulanova%20E%22%5BAuthor%5D) [Paus R,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Paus%20R%22%5BAuthor%5D) et al. IL-15/IL-15 receptor biology: a guided tour through an expanding universe [J]. [Cytokine Growth Factor Rev.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=IL-15%2FIL-15%20receptor%20biology%3A%20A%20guided%20tour%20through%20an) 2006, 17(4): 259-280.

[[42] Jakobisiak M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Jakobisiak%20M%22%5BAuthor%5D), [Golab J](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Golab%20J%22%5BAuthor%5D), [Lasek W](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Lasek%20W%22%5BAuthor%5D). Interleukin 15 as a promising candidate for tumor

Immunotherapy [J]. [Cytokine Growth Factor Rev,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21531164#%23) 2011, 22(2): 99-108.

[43] Davies E, Reid S, Medina MF, et al. [IL-15 has innate anti-tumor activity independent of NK and CD8 T cells [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20538758) J Leukoc Biol, 2010, 88(3): 529-536.

[44] Pistilli EE, Siu PM, Alway SE. Interleukin-15 responses to aging and unloading-induced skeletal muscle atrophy [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2007, 292(4): 298-304.

[45] Pedersen BK. The diseasome of physical inactivity--and the role of myokines in muscle—fat cross talk [J]. J Physiol, 2009, 587(Pt 23): 5559-5568.

[46] Rayavarapu S, Coley W, Nagaraju K. Endoplasmic reticulum stress in skeletal muscle homeostasis and disease [J]. Curr Rheumatol Rep. 2012 Jun; 14(3): 238-243.

[47] Archana Dhar and Leticia Castillo. [Insulin resistance in critical illness [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21508840) Curr Opin Pediatr. 2011 Jun; 23(3): 269-274.

[48] Samuel VT, Shulma GI. Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links[J][. Cell.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Mechanisms%2Bfor%2BInsulin%2BResistance%3A%2BCommon%2BThreads%2Band%2BMissing%2BLinks) 2012 Mar 2; 148(5): 852-71.

[[49] Martins AR](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Martins%20AR%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22360800), [Nachbar RT](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Nachbar%20RT%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22360800), et al. Mechanisms underlying skeletal muscle insulin resistance induced by fatty acids: importance of the mitochondrial function[J]. Lipids Health Dis. 2012 Feb; 23: 11-30.

[50] Lutz CT, Quinn LS. Sarcopenia, obesity, and natural killer cell immune senescence in aging: altered cytokine levels as a common mechanism[J]. Aging (Albany NY). 2012 Aug; 4(8): 535-546.

[51] Yoon JH, Kim J, Song P et al. [Secretomics for skeletal muscle cells: a discovery of novel regulators](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22781747)[J]. AdvBiolRegul. 2012May;52(2): 340-350.

[52] Vijayakumar A, Wu Y, Sun H et al. [Targeted loss of GHR signaling in mouse skeletal muscle protects against high-fat diet-induced metabolic deterioration](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22187377) [J]. Diabetes. 2012 Jan; 61(1): 94-103.

[53] Buler M, Aatsinki SM, Skoumal R et al. [Energy-sensing factors coactivator peroxisome proliferator-activated receptorγcoactivator 1-α(PGC-1α) and AMP-activated protein kinase control expression of inflammatory mediators in liver: induction of interleukin 1 receptor antagonist](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22117073) [J]. J Biol Chem. 2012 Jan 13; 287(3): 1847-1860.

[54] Barra NG, Chew MV, Holloway AC et al. [Interleukin-15 treatment improves glucose homeostasis and insulin sensitivity in obese mice](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21906226) [J]. Diabetes Obes Metab. 2012 Feb; 14(2): 190-193.

[55] Pedersen BK. [Exercise-induced myokines and their role in chronic diseases](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21354469) [J]. Brain Behav Immun. 2011 Jul; 25(5): 811-816.

[56] Tamura Y, Watanabe K, Kantani T et al. [Upregulation of circulating IL-15 by treadmill](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21307608)

[Running in healthy individuals: is IL-15 an endocrine mediator of the beneficial effects of](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21307608) [endurance exercise](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21307608)[J]. EndocrJ. 2011;58(3): 211-215.

[57] Pedersen BK. The diseasome of physical inactivity--and the role of myokines in muscle--fat cross talk[J]. J Physiol. 2009 Dec 1; 587(Pt 23): 5559-5568.

[58] Pajak B, Orzechowska S, Pijet B et al. Crossroads of cytokine signaling--the chase to stop muscle cachexia[J]. J Physiol Pharmacol. 2008 Dec; 59 Suppl 9: 251-264.

[59] Quinn LS, Anderson BG, Strait-Bodey L et al. [Oversecretion of interleukin-15 from skeletal muscle reduces adiposity](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19001550) [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2009 Jan; 296(1): E191-202.

[60] Koulmanda M, Budo E, et al. [Modification of adverse inflammation is required to cure new-onset type 1 diabetic hosts](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17670937) [J]. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Aug 7; 104(32): 13074-13079.

[61] Argilés JM, López -Soriano J, Almendro V, Busquets S, López -Soriano FJ. [Cross-talk between skeletal muscle and adipose tissue: a link with obesity](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15389734)[J]. MedResRev. 2005Jan;25(1): 49-65.

[62] Kaufman RJ. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. Genes Dev. 1999; 13:1211-1233.

**在校期间的研究成果及发表的学术论文**

第一作者，新的肌肉因子：irisin[J].生理科学进展.2013.2发表。

致 **谢**

本研究是在我的导师刘洪珍教授和北京师范大学张靓副教授、北京大学医学部生理与病理生理系分子心血管病理生理学教育部重点实验室的唐朝枢教授、齐永芬教授的精心指导下完成的。在这里，我要向他们致以最诚挚的感谢。

感谢刘洪珍教授与张靓副教授在学习、工作中给予我认真细致的指导和帮助，在论文的选题、实施以及写作等方面倾注了大量的心血，她的关心、信任和鼓励，使我树立了自信，推动我不断探索，使我在各个方面都取得了长足的进步，在此致以衷心的感谢。唐朝枢教授渊博的学识、刻苦奋斗的钻研精神、兢兢业业的工作作风、严谨求实的科学精神、公正无私的品德和包容宽厚的待人风格使我深受教益，对我今后的学习和工作将起到巨大的推动作用，将激励我一生。齐永芬教授为本研究的完成倾注了大量心血，精心指导课题的设计和实验的实施，在此致以衷心的感谢。

感谢曲阜师范大学体育科学学院所有的老师们，尤其是运动人体科学专业的郭成吉教授、孔喜良副教授、朱磊讲师，你们在论文开题中给予的建议使我大受裨益，同时感谢你们在日常生活和学习中给予的帮助和支持。

感谢北京大学医学部基础医学院的其他教授向我们开放实验室，提供仪器设备的帮助；感谢常晋瑞、赵蕾、陆薇薇、张金胜、孙云、蔡怀秋、张博、伍熙等研究生在实验具体操作上提供的支持和帮助。

感谢我的家人、同学和朋友给予的理解和支持！