

· 论著 ·

气相色谱-质谱联用结合代谢组学方法研究不同极化状态下小胶质细胞的代谢差异

王彦^a, 俞仲望^b, 陈思^a, 李玲^c, 朱臻宇^c (第二军医大学, a. 药学院药物分析学教研室; b. 基础部神经生物教研室; c. 药学院分析测试中心, 上海 200433)

[摘要] 目的 运用代谢组学方法阐明经典激活型(M1型)、选择活化型(M2型)和静息态小胶质细胞的代谢差异。方法 将体外培养小鼠小胶质细胞系(BV2)细胞,分为M1组、M2组和静息态组,用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测特异性 mRNA 的表达差异以确定细胞极化状态,采用基于气相色谱-质谱联用(GC-MS)技术的代谢组学方法阐明代谢变化。结果 发现M1型与静息态细胞的差异代谢物 15 个,M2型与静息态细胞的差异代谢物 15 个。结论 通过代谢组学方法可以找到小胶质细胞极化的差异代谢物,并解释其可能的极化机制,为神经退行性疾病的防治提供了理论依据。

[关键词] 气相色谱-质谱联用; 代谢组学; 小胶质细胞; 实时定量 PCR

[中图分类号] R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2015)03-0226-05

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2015.03.009

Comparative analysis of different states of polarized BV2 cells by GC-MS combined with metabolomic technology

WANG Yan^a, YU Zhongwang^b, CHEN Si^a, LI Ling^c, ZHU Zhenyu^c (Second Military Medical University, a. Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy; b. Institute of Neuroscience and Key Laboratory of Molecular Neurobiology of the Ministry of Education, College of Basic Medical Science; c. Pharmaceutical Analysis Center, School of Pharmacy, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To analyze the different metabolites of the classical activated (M1), alternatively activated (M2) and resting BV2 cells by metabolomics method. **Methods** The mRNAs of several potential biomarkers were determined by real-time PCR analyses to confirm the state of BV2 cells. Static GC-MS combined with metabolomics technology was used to analyze the metabolic changes. **Results** There were 15 biomarkers identified between the M1 group and the resting group, and 15 biomarkers were found in the M2 group and the resting group. **Conclusion** The present study provides an effective way to reveal the mechanism of the polarization of BV2 cell, and it might provide a theoretical basis to prevent or treat the neurodegenerative diseases.

[Key words] GC-MS; metabolomic; microglia cell; RT-PCR

小胶质细胞是一种在中枢神经系统中存在的巨噬细胞,是中枢神经系统中的主要免疫防线。它分为两种极化类型,即经典激活型(M1型)和选择活化型(M2型)。用脂多糖(LPS)和干扰素 γ (IFN- γ)刺激,可以使细胞极化成为M1型,用白介素4(IL-4)刺激可以使细胞极化成为M2型。M1型小胶质细胞主要发挥促炎作用,具有分泌促炎因子、诱导

NO合成、产生活性氧簇ROS、诱导Th1细胞免疫应答、杀死微生物和抗肿瘤功能。M2型是小胶质细胞产生免疫抑制的一种状态,具有清除寄生虫、抑制炎症、促进组织生长、促进肿瘤生长和免疫调节等功能^[1]。小胶质细胞在神经退行性疾病中具有重要作用^[2],最近的研究结果表明,小胶质细胞可以间接起到抗炎作用,而这些有益的小胶质细胞往往呈现的是选择活化型即M2型^[3],而当小胶质细胞被过度激活后则具有神经毒性,丢失了有益的功能,转而变成了促炎表型M1型^[4]。因此,研究小胶质细胞的极化机制对防治神经退行性疾病具有重要意义。

细胞代谢组学是以细胞为研究对象,通过分析其在不同环境或刺激因子干预状态下产生不同的代

[基金项目] 国家自然科学基金(81273474,31100765)

[作者简介] 王彦,硕士研究生.E-mail:wangyan_sophia@163.com

[通讯作者] 朱臻宇,博士,副教授,硕士生导师.研究方向:代谢组学.Tel:(021)81871261;E-mail:zzyzfzhu@163.com

谢产物来阐明可能的机制^[5]。关于小胶质细胞蛋白组和基因组已有报道^[6],而本研究在代谢物水平,使用基于GC-MS的代谢组学方法系统研究了M1型、M2型和静息态BV2细胞间的代谢差异,推测BV2细胞极化的发生过程,进一步完善对小胶质细胞的系统生物学研究方法。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 仪器 HA202M型天平(日本AND公司); Trace Ultra/DSQ II GC-MS型气质联用仪(美国Thermo公司);TR-5MS型石英毛细管柱(30 m×0.25 mm,0.25 μm,美国Thermo公司);EDC-810型PCR仪(东胜创新公司);Light Cycler96型RT-PCR仪(瑞士Roche公司)。

1.1.2 试剂 甲氧胺盐酸盐、N-甲基-N-三甲基硅烷基三氟乙酰胺(MSTFA)、三甲基氯硅烷(TMCS)、吡啶(Sigma公司);正庚烷、甲醇、氯仿和氯化钠(分析纯,国药集团);柱式Trizol总RNA抽提试剂盒、第一链cDNA合成试剂盒、热启动SYBR Green染料试剂盒(生工生物公司);引物由上海英骏公司合成。

1.1.3 细胞株与培养液 BV2细胞(上海生命科学研究院细胞资源中心);胎牛血清、DMEM F12培养液、双抗、磷酸缓冲液和胰酶(Gibco公司);鼠IL-4、鼠INF-γ及LPS(R&D公司);10 cm培养皿和六孔板(Corning公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 细胞用含10%胎牛血清和1%青/链霉素双抗的DMEM F12(Gibco)在37℃、5%CO₂条件下培养,当细胞融合度达到85%时,将细胞随机分为3组:静息态组(C)、M1组(M1)、M2组(M2),每组5皿。细胞用无血清培养液培养,M1组加入LPS和INF-γ刺激,M2组加入IL-4刺激,24 h后将全部培养皿取出。其中LPS的终浓度为100 ng/ml,INF-γ的终浓度为100 ng/ml,IL-4的终浓度为10 ng/ml。

1.2.2 实时定量PCR(RT-PCR) 将BV2细胞种于六孔板中,每孔10⁶个细胞,用柱式Trizol总RNA抽提试剂盒提取3组细胞的总RNA。使用第一链cDNA合成试剂盒反转录cDNA,使用热启动SYBR Green染料试剂盒进行RT-PCR检测。每组反应做3个复孔,各组分别是精氨酸酶1(Arg-1)、白介素-1β(IL-1β)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、肿瘤坏死因子α(TNF-α)、巨噬细胞甘露糖受体-1

(MRC-1)以及甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)。这些特异性基因的上下游引物序列从Eurogentec网站获取。

1.2.3 细胞样品制备 弃细胞培养液,用生理盐水洗涤2次,加入1 ml -20℃70%甲醇猝灭。小心用细胞刮刀刮下细胞,移至事先干燥称重的1.5 ml离心管中。将其在氮气下吹干,再次称重得细胞干重。在离心管中加入1.8 ml氯仿-甲醇-水(2:5:2)的乳浊液,冰水混合物中超声30 min后8 455 r/min离心10 min,取上清液,氮气下吹干后进行衍生化处理。衍生化过程中为每管加入15 mg/ml甲氧胺吡啶37.5 μl,涡旋1 min后,70℃烘箱烘干,1 h后,加入37.5 μl含1%TMCS的MSTFA,涡旋1 min,室温下放置1 h,溶于100 μl正庚烷,涡旋1 min后,6 684 r/min离心5 min,吸取100 μl上清液至进样小瓶,用于GC-MS分析。

1.2.4 GC-MS条件 进样量为1 μl;进样口温度:250℃;升温程序:起始温度为70℃,保持4 min,4℃/min升至220℃,后以8℃/min升至300℃,保持10 min。图谱从第3分钟开始采集,共采集60 min。载气:高纯氮气;流速1.0 ml/min;分流模式:10:1。

质谱条件的选择:电子轰击源(EI);离子源温度:250℃;接口温度:260℃;电子能量:70 eV;调谐方式:标准调谐;质谱扫描方式:全部扫描;范围:15~800 amu;扫描速度:5 s/dec。

1.2.5 数据处理 GC-MS原始数据经Thermo Xconvert软件转换为NetCDF格式,转换后的数据经XCMS软件进行峰校正和峰积分,产生一个保留时间、质核比、峰强度的三维矩阵后,采用MATLAB 7.0对离子峰进行过滤,仅保留相同保留时间下丰度最大的离子峰,除以每个样品的细胞干重值进行归一化,得到的数据导入SIMCA-P V11.0软件经过中心化和帕累托变换预处理,标准化后用偏最小二乘法判别分析(PLS-DA),选取VIP值(variable influence in the projection)>1作为潜在标记物,求出每个差异代谢物的RSD值,剔除>30%的数据后,与X-caliber自带的NIST库进行匹配得到最后的差异代谢物。

2 结果

2.1 RT-PCR 各组BV2细胞提取总mRNA,反转录合成cDNA,用qRT-PCR检测IL-1β、iNOS、TNF-α、Arg-1和MRC-1的表达情况,如图1所示。用LPS和鼠INF-γ刺激后可以升高iNOS、TNF-α

的水平,分别为静息态组的2.82倍和3.13倍,并使 Arg-1 的表达量显著下降,为静息态组的0.122倍。用鼠 IL-4 处理 BV2 细胞 24 h 后使 Arg-1、MRC-1 水平升高,为静息态组的 26.5 倍和 2.63 倍,而 IL-1 β 和 TNF- α 水平则明显下降,为静息态组的 0.611 倍和 0.161 倍,说明 BV2 细胞极化成功。

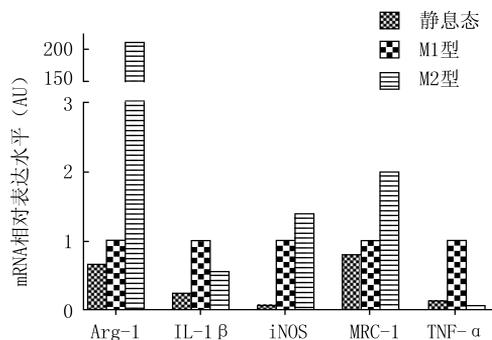


图1 qRT-PCR显示3种状态下BV2细胞特异性表达 mRNA 情况

2.2 不同状态 BV2 细胞裂解液 GC-MS 总离子流图 M1、M2 和静息态 BV2 细胞经过提取后将胞内代谢物进行衍生化处理,分析得到 GC-MS 总离子流图,其典型图谱如图 2 所示。

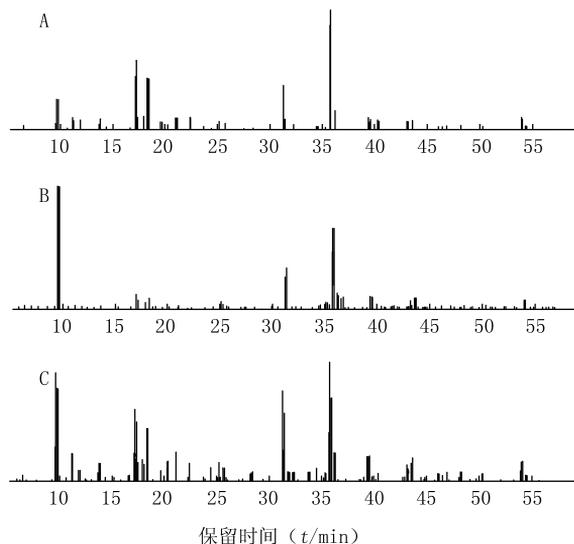


图2 静息态(A)、M1型(B)、M2型(C) BV2 细胞裂解液 GC-MS 总离子流图

2.3 标志物的寻找 通过 XCMS 软件进行峰校正和峰积分后,得到 1 058 个离子峰,通过非靶标离子筛选,去除同一内源性代谢物的碎片衍生物,简化得到 159 个离子峰。本研究中,我们构建了 PLS-DA 模型,分析比较 M1 和静息态、M2 和静息态细胞裂解液的关系,该得分图的分离趋势用 R^2 和 Q^2 表示

($R^2 X=0.712$, $R^2 Y=0.992$, $Q^2 Y=0.939$), $R^2 X$ 、 $R^2 Y$ 和 $Q^2 Y$ 是 PLS-DA 模型的评价指标。 $R^2 X$ 表示计算所得隐变量反映自变量 X 的变异程度, $R^2 Y$ 用来表示隐变量反映因变量 Y 的变异百分比, $Q^2 Y$ 为交叉验证后 PLS-DA 模型能够预测 X 和 Y 变异的能力,它们的值应尽可能接近 1,如图 3 所示。为了找到可以区分组间关系的离子峰,我们进一步使用 PLS-DA,筛选 VIP 值大于 1 的峰作为潜在差异代谢物,如图 4 所示,对照 NIST 库,挑选相似度 80% 以上,RSD 值小于 30% 的值。最终得到 M1 和静息态的差异代谢物共 15 个,涉及 9 个代谢通路,其中 D-葡萄糖、葡萄糖醇、乳酸、果糖、蔗糖、焦谷氨酸、甘氨酸、柠檬酸、磷酸、腐肉碱、阿糖醇较静息态升高,硬脂酸、油酸、甾链醇、十六烯酸较静息态降低;M2 和静息态的差异代谢物 15 个,也涉及 9 个代谢通路,其中鸟氨酸、甘氨酸、丙氨酸、氨基丙酸、谷氨酸、天冬酰胺、琥珀酸、苏氨酸、硬脂酸、棕榈酸、腐肉碱、乙醇胺、肌醇、阿糖醇、肉豆蔻酸较静息态升高,如表 1、表 2 所示。

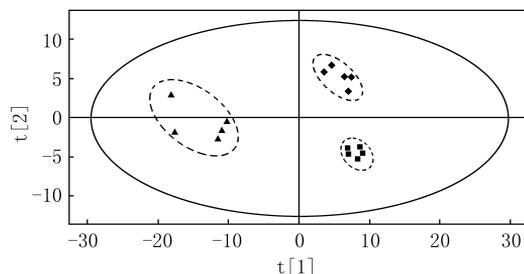


图3 由 BV2 细胞胞内代谢物 GC-MS 图谱获得的 PLS-DA 得分图
◆. 静息态;■. M1 型;▲. M2 型

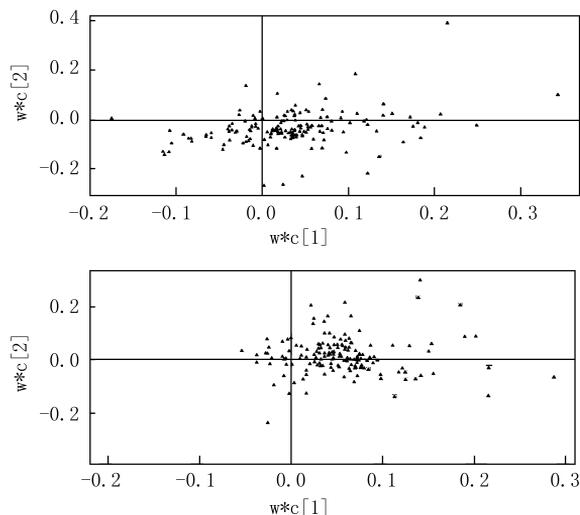


图4 BV2 细胞得分载荷图

A. M1 型与静息态;B. M2 型与静息态;▲. 差异代谢物

表1 GC-MS法测得M1与静息态BV2细胞差异代谢物的特征

编号	保留时间 (t/min)	VIP	化学名称	相关代谢通路	化学分子式	趋势	RSD(%)	倍数
1	30.88	3.25	arabinitol(阿糖醇)	戊糖及葡萄糖醛酸酯互变	C ₅ H ₁₂ O ₅	↑	16.10	143.03
2	33.51	1.57	citrate(柠檬酸)	柠檬酸循环	C ₆ H ₈ O ₇	↑	14.25	60.50
3	31.15	3.03	tetramethylenediamine(腐肉碱)	谷胱甘肽代谢	C ₄ H ₁₂ N ₂	↑	0.87	47.85
4	24.91	2.54	pyroglutamic acid(焦谷氨酸)	谷胱甘肽代谢	C ₅ H ₇ NO ₃	↑	17.24	17.97
5	35.11	1.74	fructose(果糖)	果糖及甘露糖代谢	C ₇ H ₁₅ NO ₆	↑	19.52	12.25
6	34.86	1.88	glucitol(葡萄糖醇)	果糖及甘露糖代谢	C ₇ H ₁₅ NO ₆	↑	14.72	12.13
7	49.64	1.60	sucrose(蔗糖)	半乳糖代谢	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	↑	19.65	7.52
8	17.03	4.44	phosphate(磷酸)	能量代谢	H ₃ PO ₄	↑	16.21	5.01
9	9.45	1.77	lactate(乳酸)	糖酵解	C ₃ H ₆ O ₃	↑	15.60	4.25
10	18.07	1.62	glycine(甘氨酸)	谷胱甘肽代谢	C ₂ H ₅ NO ₂	↑	12.47	4.17
11	35.48	2.05	D-glucose(D-葡萄糖)	半乳糖代谢	C ₇ H ₁₅ NO ₆	↑	17.60	2.13
12	42.82	1.63	oleic acid(油酸)	脂肪酸代谢	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	↓	28.98	0.54
13	43.34	1.39	octadecanoic acid(硬脂酸)	脂肪酸代谢	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	↓	21.13	0.51
14	54.14	1.50	desmosterol(链甾醇)	脂肪酸代谢	C ₂₇ H ₄₄ O	↓	25.99	0.38
15	38.57	1.20	hexadecylenic acid(十六烯酸)	脂肪酸代谢	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	↓	23.76	0.34

注:↑和↓表示M1型BV2细胞中该代谢物含量较静息态上调或者下调;VIP值>1被认为具有显著差异;倍数,指M1型BV2细胞中该代谢物含量与静息态组比较的相对含量

表2 GC-MS法测得M2与静息态BV2细胞差异代谢物的特征

编号	保留时间 (t/min)	VIP	化学名称	相关代谢通路	化学分子式	趋势	RSD(%)	倍数
1	20.84	1.43	threonine(苏氨酸)	甘氨酸、丝氨酸及苏氨酸代谢	C ₄ H ₉ NO ₃	↑	24.46	171.66
2	28.06	1.70	glutamic acid(谷氨酸)	精氨酸及脯氨酸代谢	C ₅ H ₉ NO ₄	↑	5.80	129.94
3	30.88	1.57	arabitol(阿糖醇)	戊糖及葡萄糖醛酸酯互变	C ₅ H ₁₂ O ₅	↑	24.38	115.02
4	31.15	2.70	tetramethylenediamine(腐肉碱)	精氨酸及脯氨酸代谢	C ₄ H ₁₂ N ₂	↑	3.53	113.17
5	10.97	2.70	alanine(丙氨酸)	丙氨酸、天冬氨酸及谷氨酸代谢	C ₃ H ₇ NO ₂	↑	4.35	72.29
6	18.07	3.59	glycine(甘氨酸)	甘氨酸、丝氨酸及苏氨酸代谢	C ₂ H ₅ NO ₂	↑	18.95	41.72
7	34.23	1.23	myristic acid(肉豆蔻酸)	脂肪酸的生物合成	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	↑	29.75	16.16
8	40.03	1.56	inositol(肌醇)	半乳糖代谢	C ₆ H ₁₂ O ₆	↑	26.38	13.32
9	16.73	1.92	cholamine(乙醇胺)	无	C ₂ H ₇ NO	↑	18.36	9.26
10	22.13	1.77	aminopropionic acid(氨基丙酸)	丙氨酸、天冬氨酸及谷氨酸代谢	C ₃ H ₇ NO ₂	↑	24.16	8.34
11	18.29	1.04	succinate(琥珀酸)	柠檬酸循环	C ₄ H ₆ O ₄	↑	29.36	3.07
12	10.73	1.08	asparagine(天门冬酰胺)	丙氨酸、天冬氨酸及谷氨酸代谢	C ₄ H ₈ N ₂ O ₃	↑	20.93	2.40
13	43.34	2.32	octadecanoic acid(硬脂酸)	脂肪酸代谢	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	↑	26.92	2.32
14	39.12	1.77	palmitic acid(棕榈酸)	脂肪酸代谢	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	↑	29.33	1.76
15	31.55	1.05	ornithine(鸟氨酸)	尿素循环	C ₅ H ₁₂ N ₂ O ₂	↑	22.65	1.74

注:↑和↓表示M2型BV2细胞中该代谢物含量较静息态上调或者下调;VIP值>1被认为具有显著差异;倍数,指M2型BV2细胞中该代谢物含量与静息态组比较的相对含量

3 讨论

3.1 糖代谢 从结果可见M1型细胞的D-葡萄糖、葡萄糖醇、乳酸、果糖、蔗糖及磷酸成分较静息态高,而M2型细胞的糖类成分没有太多变化^[1]。M1型细胞的无氧酵解增强,而M2型的无氧酵解没有显著增强,M1型BV2细胞能够打开6-磷酸果糖激酶开关,使果糖浓度升高。M1型细胞的杀菌力增强,而类似于糖酵解的无氧过程最符合此情况下升高能量的要求。另外,结果中柠檬酸成分升高,与

Halabe^[7]的研究结果相符,即柠檬酸作为三羧酸循环中的产物对糖酵解有负反馈调节作用。相反的,在M2型细胞中存在葡萄糖代谢,能够为修复组织提供持续的能量。另据Glanzer等^[6]的蛋白组学研究结果,激活后的BV2细胞中β-葡萄糖苷酶的表达式上调,该酶可以将细胞中低分子纤维糊精及一些纤维二糖、三糖分子中结合于末端的葡萄糖键打开,同时释放出葡萄糖,这与本研究结果中M1型的葡萄糖成分上调相符合。

3.2 脂质代谢 脂质代谢能够提供细胞发生吞噬

作用时的能量需求,并在细胞膜流动中起到重要作用。M1 型细胞中的 COX-2 酶上调,而 COX-1 酶下降,M2 型细胞则反之。BV2 细胞可以通过调节脂质代谢来应对所发生的炎症反应。本研究中 M2 型细胞代谢物的脂肪酸成分明显上调,而 M1 型的则下降,与 Odegaard 等^[8]的研究结果相符。同时,根据 Glanzer 等的研究结果,经过视神经及坐骨神经碎片刺激的小胶质细胞,其脂肪酸结合蛋白 3 (FABP-3)、载脂蛋白 E (apoE) 表达量上调,FABP-3 是一种细胞内的脂质结合超家族成员,而 apoE 是低密度脂蛋白胆固醇的配体,它们能够调控各种生化代谢特别是脂质代谢,其含量的升高可能与 M2 型吞噬能力增强相关,也与本研究中 M2 型细胞中脂肪酸代谢物含量升高的结果相符合。

3.3 氨基酸代谢 实验结果显示 M1 型细胞裂解液中焦谷氨酸、甘氨酸成分明显升高,M2 型细胞中鸟氨酸、琥珀酸、甘氨酸、丙氨酸、氨基丙酸、谷氨酸、苏氨酸、天冬酰胺成分明显升高。

M2 型细胞中的 Arg-1 表达量升高,Arg-1 能将精氨酸转化为鸟氨酸和尿素,因此在 M2 型细胞裂解物中可见鸟氨酸成分明显增多,这与 Van Gool 等^[9]的结论相符。由于鸟氨酸在尿素循环中存在,因此可见其下游的琥珀酸含量也升高。精氨酸酶在细胞增殖、组织修复和胶原合成中起到重要作用。与该代谢相关的半胱氨酸和酪氨酸代谢也与免疫抑制相关。根据文献^[6],M2 型细胞中的天冬酰胺基葡萄糖酶含量较静息态减少,该酶可以将天冬酰胺水解成天冬氨酸,酶的含量减少会导致天冬酰胺的蓄积,这与本研究的结果相符合。

3.4 腐胺 腐胺的含量在 M1 型中有所升高,因为腐胺在脂肪酸合成及氧化中起到重要作用,Di Marzio 等^[10]的研究显示腐胺可能具有抑制酸性脂肪酸合成的功能。腐胺在 M2 型中升高可能是因为 M2 型中鸟氨酸含量升高并在鸟氨酸脱羧酶催化下脱去羧基得到腐胺,所以其含量也明显升高。

3.5 柠檬酸 柠檬酸循环是有氧代谢的中心,可促进合成糖、脂肪、氨基酸等物质的底物。本研究中,M1 型细胞代谢物的柠檬酸含量明显升高,而 M2 型中处于柠檬酸循环中的琥珀酸含量升高。这一结果可以推测出葡萄糖作为底物的利用率的升高导致了柠檬酸循环的升高。

本研究首次使用基于 GC-MS 的代谢组学方法结合 qRT-PCR 指标研究小胶质细胞的极化机制,从中找到共 26 种差异代谢物,预测并分析了其可能的代谢通路。M1 型和 M2 型小胶质细胞对影响神经退行性疾病的进程具有重要作用,因此该研究对阐明尚不清楚的神经退行性疾病机制具有潜在意义,同时也为该病的防治提供了新的思路。

【参考文献】

- [1] Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm [J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(10):889-896.
- [2] Yamada J, Hayashi Y, Jinno S, et al. Reduced synaptic activity precedes synaptic stripping in vagal motoneurons after axotomy [J]. *Glia*, 2008, 56(13):1448-1462.
- [3] Siskova Z, Page A, O'Connor V, et al. Degenerating synaptic boutons in prion disease: microglia activation without synaptic stripping [J]. *Am J Pathol*, 2009, 175(4):1610-1621.
- [4] Ransohoff RM, Perry VH. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses [J]. *Annu Rev Immunol*, 2009, 27(4): 119-145.
- [5] Nicholson JK, Connelly J, Lindon JC, et al. Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2002, 1(2):153-161.
- [6] Glanzer JG, Enose Y, Wang T, et al. Genomic and proteomic microglial profiling: pathways for neuroprotective inflammatory responses following nerve fragment clearance and activation [J]. *J Neurochem*, 2007, 102(3):627-645.
- [7] Halabe Bucay A. The biological significance of cancer: mitochondria as a cause of cancer and the inhibition of glycolysis with citrate as a cancer treatment [J]. *Med Hypotheses*, 2007, 69(4):826-828.
- [8] Odegaard JI, Chawla A. Alternative macrophage activation and metabolism [J]. *Annu Rev Pathol*, 2011, 6(2): 275-297.
- [9] Van Gool F, Galli M, Gueydan C, et al. Intracellular NAD levels regulate tumor necrosis factor protein synthesis in a sir-tuin-dependent manner [J]. *Nat Med*, 2009, 15(2):206-210.
- [10] Di Marzio L, Alesse E, Roncaioli P, et al. Influence of L-carnitine on CD95 cross-linking-induced apoptosis and ceramide generation in human cell lines: correlation with its effects on purified acidic and neutral sphingomyelinases *in vitro* [J]. *Proc Assoc Am Physicians*, 1997, 109(2):154-163.

[收稿日期] 2014-12-02 [修回日期] 2015-03-17

[本文编辑] 顾文华