

大麻素受体1通过PI3K/AKT信号通路 介导单核巨噬细胞向M1型极化

杨琳^{1,2} 田蕾^{1,2} 常娜^{1,2} 段向辉^{1,2} 李丽英^{1,2*}

(¹首都医科大学细胞生物学系, 北京 100069; ²‘肝脏保护和再生调节’北京市重点实验室, 北京 100069)

摘要 该文采用实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)、蛋白印记实验(Western blot)、流式细胞分析(flourescence-activated cell sorting, FACS)技术检测骨髓单核巨噬细胞(bone marrow monocytes/macrophages, BMMs)中大麻素受体1(cannabinoid receptor 1, CB1)对BMMs极化的作用。结果表明, 使用1 $\mu\text{mol/L}$ ACEA(CB1激动剂)处理细胞发现, BMMs中M1型的标志物*CD86*、*IL-1*、*MIP-1 β* 、*NOS2*、*IL-6*、*TNF- α* 的mRNA水平均上调; 用流式细胞分析技术检测发现, BMMs中M1型的标志物CD86蛋白质水平上调; 使用PI3K/AKT信号通路的特异性抑制剂(LY294002)预处理BMMs, 再加入1 $\mu\text{mol/L}$ ACEA刺激细胞, 与未加入LY294002的对照组相比, 这些M1型BMMs标志物的mRNA表达均被抑制; 通过Western blot法证实ACEA使p-AKT增加, 而使用1 $\mu\text{mol/L}$ AM281(CB1药理学拮抗剂)阻断CB1功能, 则抑制了ACEA导致的p-AKT增加。上述结果说明, CB1通过PI3K/AKT信号通路介导BMMs向M1型极化。

关键词 大麻素受体1; 单核巨噬细胞极化; PI3K/AKT信号通路

Study of Cannabinoid Receptor 1 Mediated Monocytes/Macrophages M1 Polarization via PI3K/AKT Signaling Pathway

Yang Lin^{1,2}, Tian Lei^{1,2}, Chang Na^{1,2}, Duan Xianghui^{1,2}, Li Liying^{1,2*}

(¹Department of Cell Biology, Capital Medical University, Beijing 100069, China;

²Municipal Laboratory for ‘Liver Protection and Regulation of Regeneration’, Beijing 100069, China)

Abstract RT-qPCR, Western blot, flourescence-activated cell sorting (FACS) were employed to detect whether cannabinoid receptor 1 (CB1) was involved in bone marrow monocytes/macrophage (BMMs) M1 polarization. The results showed that ACEA (CB1 agonist, 1 $\mu\text{mol/L}$) promoted the mRNA levels of M1 type macrophage gene signatures (*CD86*, *IL-1*, *MIP-1 β* , *NOS2*, *IL-6*, *TNF- α*) in BMMs. The protein level of CD86 detected by FACS were increased in BMMs induced by ACEA. When BMMs were pretreated with LY294002 (specific PI3K/AKT signal pathway inhibitor), ACEA-induced (1 $\mu\text{mol/L}$) increases of M1 gene signatures mRNA levels was suppressed. Furthermore, Western blot analysis showed the protein level of phosphorylated AKT (p-AKT) was increased in ACEA-treated BMMs. When BMMs were pretreated with AM281 (CB1 antagonist, 1 $\mu\text{mol/L}$), p-AKT protein level was inhibited. The result showed that CB1 mediated monocyte/macrophage M1 polarization via PI3K/AKT signaling pathway.

Keywords cannabinoid receptor 1; macrophages polarization; PI3K/AKT signaling pathway

收稿日期: 2018-02-02 接受日期: 2018-09-04

国家自然科学基金(批准号: 81430013)资助的课题

*通讯作者。Tel: 010-83950468, E-mail: liliying@ccmu.edu.cn

Received: February 2, 2018 Accepted: September 4, 2018

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81430013)

*Corresponding author. Tel: +86-10-83950468, E-mail: liliying@ccmu.edu.cn

网络出版时间: 2018-10-29 10:12:17

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20181029.1012.002.html>

巨噬细胞是一种重要的固有免疫细胞,是导致慢性炎症反应的主要细胞,在调控代谢稳态、组织器官发育、启动和控制肝脏的炎症反应中发挥重要作用^[1-2]。炎症能诱发肝脏疾病造成肝损伤,若炎症反应进一步加剧则会导致肝纤维化、肝硬化甚至肝细胞癌^[3]。肝脏中存在着肝固有巨噬细胞(Kupffer细胞)和骨髓来源的单核巨噬细胞(bone marrow monocytes/macrophages, BMMs)两类巨噬细胞。本实验室前期的研究证明,在四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl₄)和胆管结扎(bile duct ligation, BDL)所引起的小鼠肝纤维化模型中,大量BMMs向受损肝脏募集^[4]。

巨噬细胞具有高度的功能异质性和可塑性,在不同的环境因素作用下可极化为不同亚型,从而发挥不同的生物学功能^[5]。巨噬细胞的极化是一个由信号通路分子、转录因子、转录后调节以及表观遗传学调控等多因子相互作用的复杂过程,受到细胞内多种信号分子及通路的调控。巨噬细胞依据其活化形式可分为经典活化型(M1型)和选择性活化型(M2型)两类。当巨噬细胞向M1型极化时,可以释放大量促炎细胞因子,介导组织损伤并引发炎症反应^[6]。

内源性大麻素系统在焦虑和抑郁、神经退行性变、疼痛、胃肠炎症、肥胖、心血管和肝脏损伤等各种病理情况下发挥重要作用,并且在肝损伤过程中,内源性大麻素配体升高^[7-8]。内源性大麻素系统通过两个G蛋白耦联受体发挥作用,即大麻素受体1(cannabinoid receptor 1, CB1)和CB2。CB1还参与许多疾病的发展,如肝细胞癌、糖尿病和肾脏疾病等,阻断CB1能够在胆汁淤积和CCl₄导致的小鼠肝损伤的模型中缓解纤维化,激活CB2受体能够促进巨噬细胞向M2型极化^[9-12]。

我们之前的研究也显示了在CCl₄诱导的肝损伤中CB1介导BMMs的浸润和活化,且通过RhoA/NF- κ B p65和ERK1/2信号通路介导BMMs向M1型极化,参与肝脏的炎症过程, M1型巨噬细胞在肝纤维化和慢性肝损伤的发生和发展过程中扮演着重要角色^[13-14]。

PI3K/AKT是巨噬细胞激活的一个重要的信号通路,广泛存在各种细胞中,可调节细胞的生存、生长、增殖、分化、凋亡和细胞骨架重排等^[15-16]。目前, CB1是否可通过PI3K/AKT信号通路介导BMMs

向M1型极化尚不清楚。因此,本实验以BMMs为研究对象,探讨CB1是否通过激活PI3K/AKT信号通路介导BMMs向M1型极化。

1 材料与方法

1.1 材料

ICR小鼠(30只),体质量为18~20 g, SPF级, 3~4周龄,购于首都医科大学实验动物部。动物实验由首都医科大学动物伦理委员会审批通过(审批号: AEEI-2014-131)。

1.2 试剂及仪器

实验试剂包括: 1640培养基(美国Gibco公司)、胎牛血清(美国Hyclone公司)、ACEA和AM281(美国TOCRIS/R&D公司)、SYBR Green PCR Master Mix(美国ABI公司)、M-MLV反转录试剂盒(美国Invitrogen公司)、RNeasy Mini Kit(德国Qiagen公司)、BCATM Protein Assay Kit(美国Pierce公司)、兔抗CB1多克隆抗体(美国Cayman Chemical公司)、抗GAPDH抗体(英国Abcam公司)、PE-CD86(美国BD公司)、LY294002(美国Cell Signaling Technology公司)、红外荧光染料标记的二抗(美国LI-COR公司)。

实验仪器包括: 细胞培养箱(150i, 美国Thermo公司)、Real-time PCR仪(ABPrism 7300, 美国ABI公司)、红外荧光扫描成像系统(Odyssey, 美国LI-COR公司)、离心机(5810R, 德国Eppendorf公司)、分光光度计(Nano Vue, 美国GE公司)。

1.3 培养基的制备

L929条件培养基的制备: 在75 cm²培养瓶中接种L929细胞 4.7×10^5 个,加入55 mL培养基(含GlutaMAX的DMEM+10%胎牛血清+1%青霉素/链霉素),在培养箱中培养7天,收集上清[上清中含有高浓度的巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony-stimulating factor, M-CSF)],用0.45 μ m滤膜过滤,冻存于-20 $^{\circ}$ C。完全培养基: 1640培养基+10% L929+10%胎牛血清+1%青霉素/链霉素。无血清培养基: 1640培养基+1%青霉素/链霉素。

1.4 BMMs分离培养方法

将3~4周龄ICR小鼠脱臼处死,无菌分离股骨、胫骨和肱骨,剥离其结缔组织及肌肉,用1 mL注射器(针规格: 0.45 \times 16)吸取无血清培养基冲洗骨髓腔,吹下骨髓内容物,并将内容物用70 μ m的滤网过滤到50 mL离心管中,吹打使其成单细胞悬液, 1 200 r/min

表1 引物序列
Table 1 The primer sequences

基因名称 Gene name	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')
<i>18S rRNA</i>	Sense: GTA ACC CGT TGA ACC CCA TT Antisense: CCA TCC AAT CGG TAG TAG CG
<i>CD86</i>	Sense: TCC AAG TTT TTG GGC AAT GTC Antisense: CCT ATG AGT GTG CAC TGA GTT AAA CA
<i>IL-1</i>	Sense: ACT ACA GGC TCC GAG ATG AAC AAC Antisense: TCC ATT GAG GTG GAG AGC TTT C
<i>MIP-1β</i>	Sense: CCA GCT CTG TGC AAA CCT AAC C Antisense: GCC ACG AGC AAG AGG AGA GA
<i>NOS2</i>	Sense: TGA CGG CAA ACA TGA CTT CAG Antisense: GGT GCC ATC GGG CAT CT
<i>IL-6</i>	Sense: CTC TGG GAA ATC GTG GAA ATG Antisense: AAG TGC ATC ATC GTT GTT CAT ACA
<i>TNF-α</i>	Sense: GGC AGG TTC TGT CCC TTT CA Antisense: CTG TGC TCA TGG TGT CTT TTC TG

离心5 min, 弃上清, 用PBS冲洗3次, 用完全培养基悬浮, 细胞计数, 每个10 cm培养皿中接种的细胞数为 2.4×10^7 , 置于培养箱中, 第3、5天换液, 骨髓细胞在高浓度 M-CSF刺激下第6天可定向分化发育成为成熟的巨噬细胞。

1.5 实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)

细胞总RNA的提取: 将BMMs饥饿12 h后, 加入ACEA(用于研究CB1受体功能的特异性激动剂, 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 和1 $\mu\text{mol/L}$)刺激6 h, 处理后的细胞用预冷PBS清洗, 加入350 μL 裂解液, 收集裂解底物, 采用Qiagen公司的RNeasy Mini Kit提取全细胞RNA, 并用Nano Vue检测RNA的浓度及纯度。反转录方法制备cDNA: 依次在PCR反应管中加入稀释后总RNA 4.0 μL (2.0 μg)、Oligo(dT)15(0.5 μL)、10 mmol/L dNTP(1.0 μL)、超纯水(6.5 μL), 65 $^{\circ}\text{C}$ 孵育5 min, 立即转入冰浴中, 4 000 r/min离心1 min, 加入5 \times 第一链缓冲液(4.0 μL)、0.1 mmol/L DTT(二硫苏糖醇, 2.0 μL)、MMLV(200 000 units, 1.0 μL)、超纯水(1.0 μL), 轻轻混匀, 4 000 r/min离心1 min, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育50 min; 70 $^{\circ}\text{C}$ 孵育15 min终止反应, 冰浴冷却(不加反转录酶的反应体系作为阴性对照)。样本测定: 使用选定的引物对样本进行实时荧光定量聚合酶链反应, 反应体系为: H_2O (8.0 μL), Primer-F(10 $\mu\text{mol/L}$)(0.5 μL)、Primer-R (10.0 $\mu\text{mol/L}$)(0.5 μL)、稀释后的cDNA 1.0 μL (1.0 μg)、Power SYBR Green Master Mix(2 \times)(10.0 μL), 以18S rRNA为内参, 用 $\Delta\Delta Ct$ 计算mRNA表达, mRNA相对量= $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (目的基因 Ct -18S rRNA Ct)^[17]。将空白对照组的mRNA表

达量设定为1, 计算各组mRNA(*CD86*、*IL-1*、*MIP-1 β* 、*NOS2*、*IL-6*、*TNF- α*)的相对表达量, 实验独立重复3次。所用引物序列见表1。

1.6 流式细胞分析

收取加入1 $\mu\text{mol/L}$ ACEA(CB1受体激动剂)刺激6 h后的细胞至流式管中, 分别加入抗体PE-CD86和其同型对照抗体, 室温避光孵育15 min, PBS冲洗2次, 1 200 r/min离心5 min, 细胞沉淀中加入500 μL PBS重悬, 70目滤网过滤, 进行流式细胞检测。将空白对照组的CD86表达量设定为1, 计算加入1 $\mu\text{mol/L}$ ACEA刺激6 h后CD86的相对表达量, 实验独立重复3次。

1.7 蛋白印记实验

收取细胞, 在4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下加入RIPA裂解液提取BMMs中的总蛋白, 参照BCA Protein Assay Kit的说明书对蛋白进行定量。每孔上样50 μg 蛋白样品进行SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳并转移到PVDF膜上, 用含5%脱脂奶粉的TBST溶液室温摇床封闭1 h, 加入anti-P-AKT按1:1 000稀释, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBS洗涤3次, 每次10 min, 加入山羊抗兔二抗按1:10 000稀释, 室温孵育1 h, TBST洗涤3次, 每次10 min, Odyssey红外荧光扫描成像。标本中内参GAPDH(1:1 000)的测定采用相同步骤, 将空白对照组蛋白表达量设为1, 计算各组(加入ACEA 15 min、45 min和60 min)蛋白相对表达量, 实验独立重复3次。

1.8 数据统计

采用SPSS 20.0软件进行统计学分析。实验数据以 $\text{mean} \pm \text{S.D.}$ 形式表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ACEA上调BMMs M1型标志物mRNA的表达

为了探讨CB1在BMMs中的重要作用,我们将BMMs培养7天,饥饿12 h后,加入ACEA(用于研究CB1受体功能的特异性激动剂, 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 和1 $\mu\text{mol/L}$)刺激6 h^[14],提取细胞的总RNA进行RT-qPCR,检测M1型巨噬细胞标志物*CD86*、*IL-1*、*MIP-1 β* 、*NOS2*、*IL-6*、*TNF- α* 在mRNA水平上的表达情况。图1结果显示,加入1 $\mu\text{mol/L}$ ACEA刺激6 h后, M1型巨噬细胞标志物*CD86*、*IL-1*、*MIP-1 β* 、*NOS2*、*IL-6*、*TNF- α* 表达均明显上调。

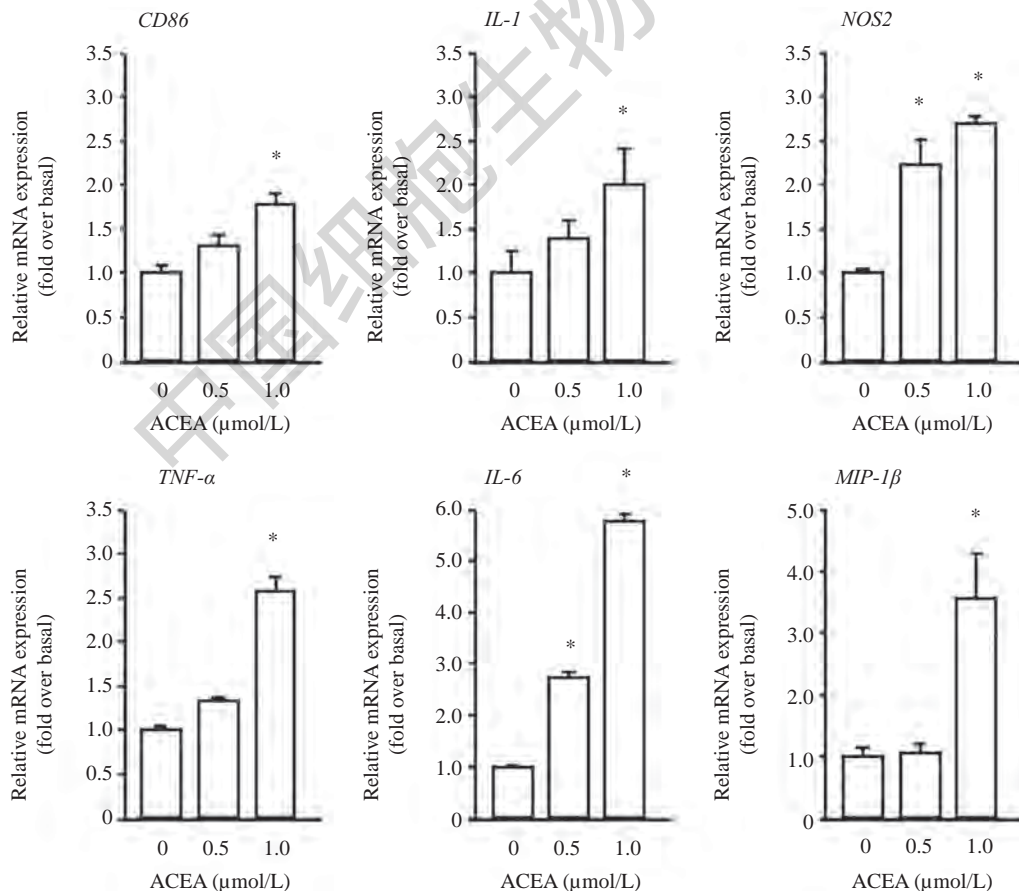
2.2 ACEA上调BMMs M1型标志物蛋白质水平的表达

为了进一步探讨CB1在BMMs中的重要作用,我们将BMMs培养7天,饥饿12 h后,加入1 $\mu\text{mol/L}$ ACEA刺激6 h,应用流式细胞分析术检测M1型巨噬细胞标志物*CD86*在蛋白质水平上的表达情况。图

2结果显示,加入1 $\mu\text{mol/L}$ ACEA刺激6 h后, M1型巨噬细胞标志*CD86*明显上调。该结果提示, ACEA促进BMMs向M1型极化。

2.3 阻断PI3K/AKT信号通路下调BMMs M1型标志物mRNA的表达

为了探讨CB1对BMMs向M1型极化的影响,我们将BMMs培养7天,饥饿12 h后,加入10 $\mu\text{mol/L}$ LY294002^[18](PI3K/AKT信号通路的特异性抑制剂)预处理1 h,再加入1 $\mu\text{mol/L}$ ACEA刺激6 h,提取细胞的总RNA进行RT-qPCR,检测M1型巨噬细胞标志物*CD86*、*IL-1*、*MIP-1 β* 、*NOS2*、*IL-6*、*TNF- α* 在mRNA水平上的表达情况。结果显示,加入LY294002与未加入LY294002的对照组相比, *CD86*、*IL-1*、*MIP-1 β* 、*NOS2*、*IL-6*、*TNF- α* 表达均明显下调。该结果提示, LY294002能明显地抑制CB1介导的BMMs向M1型极化(图3), PI3K/AKT信号参与了CB1诱导的M1型BMMs的极化。

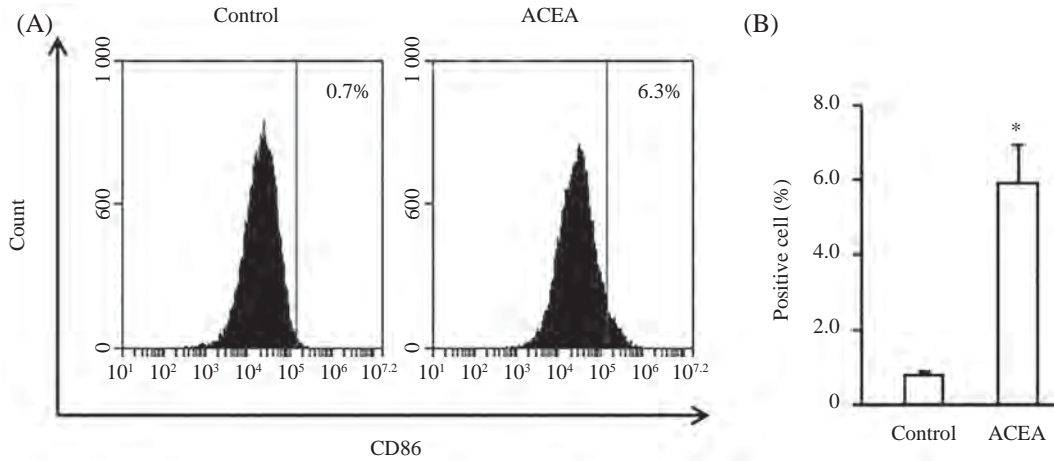


* $P < 0.05$, 与对照组(0 $\mu\text{mol/L}$ ACEA组)相比。

* $P < 0.05$ compared with control group (0 $\mu\text{mol/L}$ ACEA group).

图1 ACEA对M1型BMMs标志物mRNA水平表达的作用

Fig.1 ACEA treatment promoted the expression of M1 gene signatures in BMMs

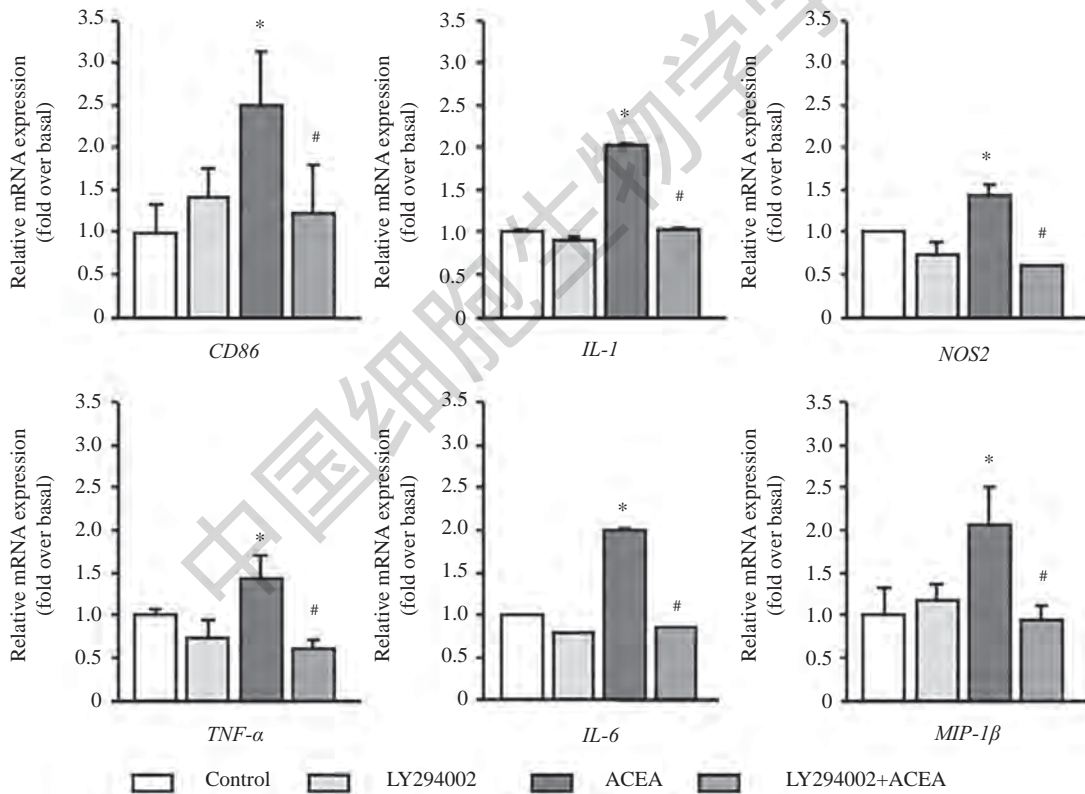


A: FACS检测CD86的表达; B: CD86的表达量化图; * $P < 0.05$, 与对照组相比。

A: CD86 expression by FACS; B: quantification of CD86 expression; * $P < 0.05$ compared with control group.

图2 ACEA对M1型BMMs标志物蛋白质水平表达的作用

Fig.2 ACEA treatment promoted the protein expression of CD86 in BMMs



* $P < 0.05$, 与对照组相比; # $P < 0.05$, 与ACEA组相比。

* $P < 0.05$ compared with control group, # $P < 0.05$ compared with ACEA group.

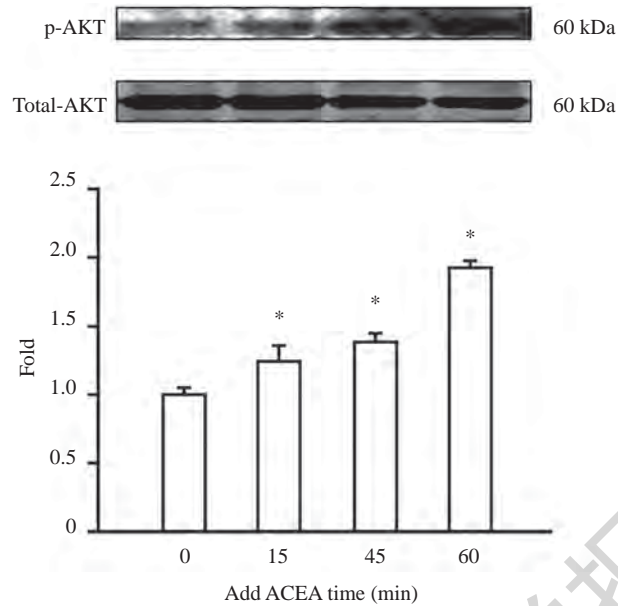
图3 PI3K/AKT抑制剂对M1型BMMs标志物表达的作用

Fig.3 LY294002 treatment inhibited the expression of M1 gene signatures in BMMs

2.4 激活CB1上调BMMs中p-AKT蛋白质的表达

AKT是PI3K信号通路下游关键蛋白之一, AM281是CB1的药理学阻断剂。为了检测CB1对PI3K/AKT信号通路的影响, 在饥饿12 h的BMMs中加入1 $\mu\text{mol/L}$

ACEA分别刺激15 min、45 min和60 min^[14], 用Western blot方法检测p-AKT和Total-AKT蛋白表达的情况。结果显示, 随着时间的增加p-AKT蛋白质水平显著提高, 加入ACEA 15 min、45 min和60 min后p-AKT约为

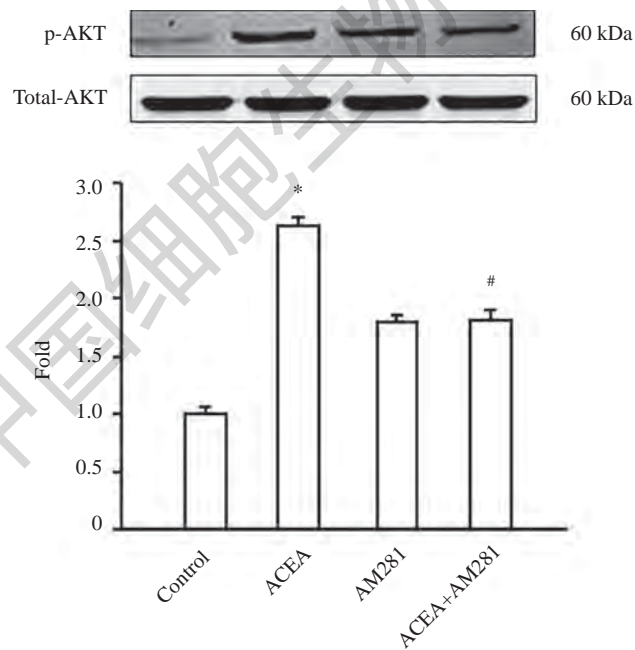


* $P < 0.05$, 与加入ACEA 0 min组相比。

* $P < 0.05$ compared with adding ACEA 0 min group.

图4 ACEA激活CB1促进BMMs中p-AKT的表达

Fig.4 ACEA activated CB1 and promoted the expression of p-AKT in BMMs



* $P < 0.05$, 与对照组相比; # $P < 0.05$, 与ACEA组相比。

* $P < 0.05$ compared with control group; # $P < 0.05$ compared with ACEA group.

图5 AM281抑制CB1激活的BMMs中p-AKT的表达

Fig.5 Pretreatment with AM281 inhibited the increase of p-AKT in BMMs

加入ACEA 0 min的1.25、1.38、1.92倍,表明ACEA使CB1活化并激活PI3K/AKT信号通路(图4)。

2.5 抑制CB1激活下调BMMs中p-AKT蛋白质的表达

在饥饿12 h的BMMs中,用AM281(CB1药理学

拮抗剂)预处理1 h再加入1 $\mu\text{mol/L}$ ACEA刺激1 h,结果显示,在没有AM281的情况下,加入ACEA刺激1 h使p-AKT表达上调约为2.63倍,而有AM281的情况下,ACEA上调p-AKT表达的功能就被明显抑制(图5)。这些结果提示,使用ACEA激活CB1,可

以在蛋白水平使PI3K/AKT信号通路激活, AM281阻断了CB1的功能抑制PI3K/AKT信号通路激活。

3 讨论

巨噬细胞的功能性极化在慢性炎症、组织修复、感染、过敏、肿瘤和肥胖等多种疾病过程中发挥重要作用。极化的巨噬细胞是疾病发生过程中非常关键的细胞事件, 被认为是疾病发展和转归的一个关键因素。巨噬细胞在不同的微环境中极化为M1型, 介导炎症应答, 其极化或者激活是其发挥作用的第一步, 因此, 巨噬细胞向M1型的极化是启动、维持以及加剧炎症反应的关键因素^[19]。故对于M1型骨髓来源的单核巨噬细胞(BMMs)极化的分子机制备受关注。

尽管CB1在免疫系统的表达量低, 但是它在调节免疫系统的过程中扮演着一个重要的角色。也有报道发现, 在多发硬化、炎症性肠病和Crohn病等多种免疫疾病中, CB1发挥重要的作用^[20-21]。本实验室之前也已经报道, 阻断CB1可以抑制BMMs的浸润和活化从而减轻炎症和肝纤维化^[13]。

巨噬细胞极化受到多个信号通路调控, 不同的转录因子由不同的信号分子激活从而调控特定基因的表达。CB1作为G蛋白耦联受体, 依赖于多种信号通路发挥生物学功能, 如MAPKs、AMPK^[22]。PI3K/AKT信号通路在巨噬细胞激活和基因表达中扮演重要的角色, 所以我们着重关注CB1是否可以通过PI3K/AKT信号通路对BMMs向M1极化的作用。加入ACEA能够使BMMs中的M1型细胞标志物表达上调, 说明ACEA激活CB1介导BMMs向M1型极化。加入PI3K/AKT信号通路的特异性抑制剂LY294002则可阻断ACEA诱导的BMMs中M1型标志物mRNA水平表达的上调。同时, 加入ACEA可以使PI3K的下游关键蛋白p-AKT活化增加, 而加入AM281(CB1药理学拮抗剂)可以抑制ACEA诱导的p-AKT的活化。这些结果提示, 使用ACEA激活CB1可以在mRNA水平和蛋白质水平使PI3K/AKT信号通路激活, AM281阻断了CB1的功能从而抑制PI3K/AKT信号通路激活。而在我们的前期研究中也已证实, CB1可通过RhoA/NF- κ B p65以及ERK1/2信号通路影响BMMs向M1型极化^[14]。也有文献报道, PI3K通过其下游RhoA和AKT影响小鼠胚胎干细胞极化和迁移^[23], 在调控血小板actin细胞骨架的过程中, PI3K

可能作为RhoA/mDia1上游分子参与该调控过程^[24]; 在索拉菲尼耐药的肝癌细胞中, PI3k/Akt信号通路可能促进MAPK/ERK信号通路再次激活, LY294002通过抑制PI3K/AKT信号通路活化间接抑制MAPK/ERK信号通路再次激活^[25]。因此, CB1可能通过激活PI3K/AKT信号通路, 影响其下游的RhoA/NF- κ B p65以及ERK1/2信号通路来影响BMMs向M1型极化, 从而产生不同的生理或病理学功能, 参与疾病的发生和发展。以上结果仍然需要在慢性肝损伤的模型中进行进一步研究, 为CB1调控肝脏损伤提供更多证据。CB1作为肝纤维化的治疗靶点之一, 其药理学阻断剂利莫那班曾经被应用于临床实验中, 但由于其有较大的副作用故被叫停。尽管如此, 由于CB1在疾病中起关键作用, 所以关于它的研究仍在继续进行, 并且作用于外周组织的CB1受体拮抗剂也被不断地研发出来^[26]。有研究表明, CB1的失活能够改善肝脏纤维化^[27]。AM281是一种新型合成的CB1的特异性药理学阻断剂, 其具体的特性和机制仍需要进行进一步研究。

综上所述, 本研究发现, CB1通过PI3K/AKT信号通路介导了BMMs向M1型极化。这一研究结果为通过抑制CB1来抑制PI3K/AKT信号通路从而影响BMMs向M1型极化的研究提供了新的思路。BMMs向M1型的极化是炎症反应组织损伤的关键因素, 因而抑制M1型BMMs的极化是抑制炎症反应、减轻组织损伤的重要方法之一。本研究结果为开发以通过CB1作用于BMMs来治疗肝脏纤维化的药物提供了一定的理论依据和诊疗策略。

参考文献 (References)

- 1 Ginhoux F, Jung S. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat Rev Immunol* 2014; 14(6): 392-404.
- 2 Bhargava P, Lee CH. Role and function of macrophages in the metabolic syndrome. *Biochem J* 2012; 442(2): 253-62.
- 3 Park EJ, Lee JH, Yu GY, He G, Ali SR, Holzer RG, *et al.* Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression. *Cell* 2010; 140(2): 197-208.
- 4 Han Z, Zhu TP, Liu XH, Li CY, Yue S, Liu X, *et al.* 15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2 reduces recruitment of bone marrow-derived monocyte/macrophages in chronic liver injury in mice. *Hepatology* 2012; 56(1): 350-60.
- 5 Sica A, Invernizzi P, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization in liver homeostasis and pathology. *Hepatology* 2014; 59(5): 2034-42.

- 6 Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: *in vivo* veritas. *J Clin Invest* 2012; 122(3): 787-95.
- 7 Di Marzo V. Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce? *Nat Rev Drug Discov* 2008; 7(5): 438-55.
- 8 Siegmund SV, Schwabe RF. Endocannabinoids and liver disease. II. Endocannabinoids in the pathogenesis and treatment of liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 294(2): G357-62.
- 9 Liu LY, Alexa K, Cortes M, Schatzman-Bone S, Kim AJ, Mukhopadhyay B, *et al.* Cannabinoid receptor signaling regulates liver development and metabolism. *Development* 2016; 143(4): 609-22.
- 10 Suk KT, Mederacke I, Gwak GY, Cho SW, Adeyemi A, Friedman R, *et al.* Opposite roles of cannabinoid receptors 1 and 2 in hepatocarcinogenesis. *Gut* 2016; 65(10): 1721-32.
- 11 Louvet A, Teixeira-Clerc F, Chobert MN, Deveaux V, Pavoine C, Zimmer A, *et al.* Cannabinoid CB2 receptors protect against alcoholic liver disease by regulating Kupffer cell polarization in mice. *Hepatology* 2011; 54(4): 1217-26.
- 12 Montalbano R, Honrath B, Wissniowski TT, Elxnat M, Roth S, Ocker M, *et al.* Exogenous hepatitis B virus envelope proteins induce endoplasmic reticulum stress: involvement of cannabinoid axis in liver cancer cells. *Oncotarget* 2016; 7(15): 20312-23.
- 13 Mai P, Yang L, Tian L, Wang L, Jia S, Zhang Y, *et al.* Endocannabinoid system contributes to liver injury and inflammation by activation of bone marrow-derived monocytes/macrophages in a CB1-dependent manner. *J Immunol* 2015; 195(7): 3390-401.
- 14 Tian L, Li W, Yang L, Chang N, Fan X, Ji X, *et al.* Cannabinoid receptor 1 participates in liver inflammation by promoting M1 macrophage polarization via RhoA/NF- κ B p65 and ERK1/2 pathways, respectively, in mouse liver fibrogenesis. *Front Immunol* 2017; 28; 8: 1214.
- 15 Chang L, Zhao D, Liu HB, Wang QS, Zhang P, Li CL, *et al.* Activation of sonic hedgehog signaling enhances cell migration and invasion by induction of matrix metalloproteinase-2 and -9 via the phosphoinositide-3 kinase/AKT signaling pathway in glioblastoma. *Mol Med Rep* 2015; 12(5): 6702-10.
- 16 Green BD, Jabbour AM, Sandow JJ, Riffkin CD, Masouras D, Daunt CP, *et al.* Akt1 is the principal Akt isoform regulating apoptosis in limiting cytokine concentrations. *Cell Death Differ* 2013; 20(10): 1341-9.
- 17 张媛媛, 李伟阳, 杨琳, 李丽英. 磷酸鞘胺醇调节小鼠单核巨噬细胞炎性细胞因子表达的机制研究. 首都医科大学学报 (Zhang Yuanyuan, Li Weiyang, Yang Lin, Li Liying. Regulation of inflammatory cytokine expression of sphingosine 1-phosphate in murine monocyte/macrophage J774A. 1. *Journal of Capital Medical University*) 2015; 5(36): 729-33.
- 18 Yang L, Han Z, Tian L, Mai P, Zhang Y, Wang L, *et al.* Sphingosine 1-phosphate receptor 2 and 3 mediate bone marrow-derived monocyte/macrophage motility in cholestatic liver injury in mice. *Sci Rep* 2015; 5: 13423.
- 19 Ammit AJ, Hastie AT, Edsall LC, Hoffman RK, Amrani Y, Krymskaya VP, *et al.* Sphingosine 1-phosphate modulates human airway smooth muscle cell functions that promote inflammation and airway remodeling in asthma. *FASEB J* 2001; 15(7): 1212-4.
- 20 Wong BS, Camilleri M, Eckert D, Carlson P, Ryks M, Burton D, *et al.* Randomized pharmacodynamic and pharmacogenetic trial of dronabinol effects on colon transit in irritable bowel syndrome-diarrhea. *Neurogastroenterol Motil* 2012; 24(4): 358-e169.
- 21 Storr M, Emmerdinger D, Diegelmann J, Pfennig S, Ochsenkuhn T, Goke B, *et al.* The cannabinoid 1 receptor (CNR1) 1359 G/A polymorphism modulates susceptibility to ulcerative colitis and the phenotype in Crohn's disease. *PLoS One* 2010; 5(2): e9453.
- 22 Turu G, Hunyady L. Signal transduction of the CB1 cannabinoid receptor. *J Mol Endocrinol* 2010; 44(2): 75-85.
- 23 Bekhite MM, Müller V, Tröger SH, Müller JP, Figulla HR, Sauer H, *et al.* Involvement of phosphoinositide 3-kinase class IA (PI3K 110 α) and NADPH oxidase 1 (NOX1) in regulation of vascular differentiation induced by vascular endothelial growth factor (VEGF) in mouse embryonic stem cells. *Cell Tissue Res* 2016; 364(1): 159-74.
- 24 高广勋, 董红娟, 顾宏涛, 高瑛, 潘耀柱, 杨洋, 等. PI3K调控血小板聚集过程中RhoA活性及其与mDia1相互作用. 中国实验血液学杂志 (Gao Guangxun, Dong hongJuan, Gu Hongtao, Gao Ying, Pan Yaozhu, Yang Yang, *et al.* PI3-kinase mediates activity of RhoA with mDia1 thrombin-induced platelet aggregation. *Journal of Experimental Hematology*) 2009; 17(6): 1555-9.
- 25 王清清, 刘俊, 曹浩强, 张浩. LY294002阻断PI3k/Akt信号通路逆转肝癌细胞对索拉菲尼耐药的研究. 全科医学临床与教育 (Wang Qingqing, Liu Jun, Cao Haoqiang, Zhang Hao. Research about the sorafenib resistance of hepatocellular carcinoma cells reversed by LY294002 through blocking PI3k/Akt pathway. *Clinical Education of General Practice*) 2016; 14(6): 612-6, 721.
- 26 Le Foll B, Gorelick DA, Goldberg SR. The future of endocannabinoid-oriented clinical research after CB1 antagonists. *Psychopharmacology (Berl)* 2009; 205(1): 171-4.
- 27 Teixeira-Clerc F, Julien B, Grenard P, Tran Van Nhieu J, Deveaux V, Li L, *et al.* CB1 cannabinoid receptor antagonism: a new strategy for the treatment of liver fibrosis. *Nat Med* 2006; 12(6): 671-6.