

SIRT1 siRNA 对胰岛素抵抗模型小鼠脂代谢和血小板功能的影响 *

王长本¹ 孟凡萍¹ 郝 坡² 熊 见¹ 李良琼¹

(1 重庆三峡中心医院临检科 重庆 404000 2 重庆三峡医药高等专科学校 重庆 404020)

摘要 目的 构建携带小鼠沉默信息调节蛋白 1 (SIRT1) siRNA 的腺病毒载体,并检测其对胰岛素抵抗模型小鼠脂代谢和血小板功能的影响。方法:首先化学合成小鼠 SIRT1 shRNA 片段,并将目的片段亚克隆入穿梭质粒 pShuttle-U6,用 *Pme* I 线性化后与 pAdeasy-1 在 BJ5183 内同源重组,筛选、鉴定、测序后,在 XL10-Gold 中扩增重组腺病毒质粒,最后在 293 细胞内包装扩增为重组腺病毒 Ad-SIRT1 SiRNA。用此重组腺病毒感染 3T3-L1 脂肪细胞,用 RT-PCR 和 ELISA 检测其 SIRT1 mRNA 和蛋白表达从而鉴定其有效性。然后再将重组病毒导入胰岛素抵抗模型小鼠,检测其对小鼠脂代谢和血小板功能的影响。结果 HF 组血清胆固醇、甘油三酯、游离脂肪酸和低密度脂蛋白胆固醇显著高于正常对照组 ($P<0.05$),而在 HR 组上述指标则显著低于 HF 组 ($P<0.05$)。且 HF 组高密度脂蛋白胆固醇显著低于正常对照组 ($P<0.05$),在 HR 组,高密度脂蛋白胆固醇则显著高于 HF 组 ($P<0.05$)。血小板活化测定结果显示,与正常对照组相比,HF 组血小板早期活化程度显著增强 ($P<0.05$),而 HR 组血小板早期活化程度则比 HF 组显著减弱 ($P<0.05$),三个组中血小板晚期活化程度无显著性差异 ($P>0.05$)。结论 携带目的基因的腺病毒载体感染脂肪细胞后,能显著影响其 SIRT1 mRNA 和蛋白表达,并影响胰岛素抵抗模型小鼠脂代谢和血小板功能。

关键词: RNA 干扰 腺病毒载体 SIRT1 葡萄糖转运

中图分类号 Q95-3, R589.2 **文献标识码**: A **文章编号**: 1673-6273 (2012) 02-242-05

The Effects of SIRT1 SiRNA on the Bloodfat and Activated Platelets in Insulin Resistance Mice*

WANG Chang-ben¹, MENG Fan-ping¹, HAO Po², XIONG Jian¹, LI Liang-qiong¹

(1 Department of Clinical Laboratory, Chongqing Three-gorges Central Hospital, Wanzhou, Chongqing 404000;

2 Chongqing Three-gorges Medical College, Wanzhou, Chongqing 404020)

ABSTRACT Objective: To construct the RNA interference adenovirus expression vector specific for SIRT1 gene and to observe its effect on the bloodfat and activated platelets in mice. **Methods**: Firstly, mice SIRT1 gene shRNA fragment were designed, synthesized, and cloned into the vector pshuttle-U6. The adenovirus vector plasmids, Ad-SIRT1 was constructed according to a two-step transformation protocol. Then transfected them into 293 packaging cells to grow adenovirus, which were further multiplied. Then 3T3-L1 cells were infected with the two recombinant adenoviruses respectively. The mRNA expression and protein levels of SIRT1 in these cells were evaluated by semi-quantitative RT-PCR and ELISA. Further, High insulin-normal glucose clamp was carried out 16 weeks later. Got the blood from jugular vein, analyze the bloodfat and the activated platelets. **Results**: The recombinant adenoviral plasmids Ad-SIRT1 was successfully constructed. They remarkably downregulated the expression of SIRT1 at both the mRNA and protein levels in transfected 3T3-L1 cells, and The TG, TC, FFA and LDL-C in HF group is significantly higher than NC group, but it is significantly lower in HR group than in HF group. While the HDL-C in HF group is significantly higher than NC group and HR group. Contrast with the NC group, the earlier activated platelets in HF group is higher but it is no longer higher in HF group. There is no difference of the advanced activated platelets in the three groups. **Conclusion**: The siRNA eukaryotic expression vectors against SIRT1 mRNA effectively inhibited the expression of SIRT1 in 3T3-L1 adipocytes, and down regulated the bloodfat and inhibited the earlier platelets activation in mice.

Key words: RNA interference; SIRT1; Insulin-normal glucose clamp

Chinese Library Classification (CLC): Q95-3, R589.2 **Document code**: A

Article ID: 1673-6273(2012)02-242-05

胰岛素抵抗已经成为众多疾病如 2 型糖尿病、动脉粥样硬化及脂代谢综合症等的重要病因,胰岛素抵抗机体血清胆固醇、甘油三酯、游离脂肪酸等升高^[1],亦有研究表明胰岛素抵抗个体血小板活化增强^[2]。沉默信息调节蛋白 (silence information regulator 2, SIRT2) 是 NAD 依赖性的蛋白脱乙酰酶家族成员,在

改善胰岛素抵抗细胞功能,促进胰岛素分泌方面作用^[3],本研究构建携带 SIRT1 SiRNA 的腺病毒载体,经高脂喂养小鼠,塑造胰岛素抵抗模型,经高胰岛素-正葡萄糖钳夹实验,探讨白藜芦醇对胰岛素抵抗个体血脂和血小板活化的影响。

* 基金项目 重庆市卫生局科研项目 (2008-2-38),重庆市万州区科技项目 (20080049, 200903006)

作者简介 王长本,男,主任检验师,主要从事临床检验及脂代谢方面工作和研究。

E-mail: wangchangben163@sina.com, Tel: 13896379203

(收稿日期 2011-06-16 接受日期 2011-07-12)

1 材料和方法

1.1 材料

SIRT1 shRNA 以及 RNAi 阴性对照序列 GFPshRNA 根据 Genebank 中的基因序列,通过 Ambion 公司在线工具设计,并由宝生物公司化学合成,穿梭质粒载体 pshuttle-U6 由重庆医科大学李伶教授惠赠。AdEasy™ XL 腺病毒载体系统(Stratagene 公司) PCR 试剂盒 (Takara 公司) DH5 α 、AD293 细胞和 3T3-L1 前脂肪细胞株为本课题组留存;限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、Taq 酶(New England Biolabs 公司) 质粒小抽试剂盒、胶回收试剂盒(华舜公司) 质粒大抽试剂盒(Axygene 公司) 胎牛血清(杭州四季青公司) 小鼠 SIRT1ELISA 检测试剂盒(Phoenix 公司) Lipfectamin2000 (Invitrogen 公司) 卡那霉素、酶解酪蛋白、3- 异丁基 -1- 甲基黄嘌呤 (IBMX)、胰岛素(Insulin)、地塞米松 (DEX) (Sigma 公司) 序列分析(上海鼎安生物科技有限公司)。C57BL/6J 小鼠 30 只 (SPF 级,4 周龄,体重 18-20g,雌雄各半)、小鼠基础饲料及高脂饲料均购自重庆医科大学实验动物中心。全自动生化分析仪 (Cobas 6000) 及试剂为罗氏公司产品,流式细胞仪 (BD FACScalibur) 为 BD 公司产品

1.2 方法

1.2.1 SIRT1-siRNA 穿梭质粒的构建 用 *Xho* I 和 *Not* I 双酶切穿梭质粒载体 pShuttle-U6,胶回收大片段 (7.0kb),分别与化学合成的两端已带有 *Xho* I 和 *Not* I 酶切位点的片段 SIRT1-1 和 GFPshRNA 用 T4 DNA 连接酶 16℃ 连接过夜,转化 DH5 α 感受态细胞,经 LB 卡那霉素抗性平板筛选阳性菌落后,小量抽提质粒,酶切并测序鉴定阳性克隆,得到的重组子命名为 pShuttle-U6-SIRT1 和 pShuttle-U6-GFP。

1.2.2 重组腺病毒质粒的构建 用 *Pme* I 酶切构建好的穿梭质粒使其线性化,胶回收后,分别电穿孔转入 BJ5183-Adeasy-1 电转感受态细胞 (电压 2.5KV,电容 2.5 μ F,电阻 200 Ω),LB 卡那霉素抗性筛选阳性菌落,小量提取质粒,*Pac* I 酶切鉴定阳性克隆后,将重组子转化入 XL10-Gold 超感受态细胞扩增,再次小量提取质粒,经 *Pac* I 酶切、PCR 和测序鉴定后,大量提取质粒。得到的重组子命名为 pAd-SIRT1 和 pAd-GFP。

1.2.3 重组腺病毒的包装、扩增及滴度测定 用含 10%FBS 的 DMEM 高糖培养基培养 AD293 细胞。按 5×10^5 个细胞/孔接种于无菌 6 孔板中,50 mL/L CO₂,37℃ 饱和湿度条件下培养。*Pac* I 消化重组腺病毒质粒后,按 lipfectamine2000 推荐的优化条件转染 293 细胞,5~7d 出现细胞病变反应(CPE)后,收集病毒,命名为 Ad-SIRT1 和 Ad-GFP。腺病毒滴度测定采用空斑形成实验(Plaque Assay) 将 AD293 细胞接种于 6 孔板上,待细胞达到 80%~90% 融合时,加入不同倍数稀释的病毒上清 500 μ L,50 mL/L CO₂,37℃ 饱和湿度条件下培养 10d 后,加入中性红溶液,37℃ 培养 2 h 后统计空斑数量,根据公式:空斑数量/稀释因子 $\times$ 病毒稀释液体积,计算病毒滴度。

1.2.4 重组腺病毒感染脂肪细胞 将 3T3-L1 前脂肪细胞分别接种于两个六孔板,待细胞生长汇合至单层 2d 后开始诱导。分别以 IBMX+DEX+Insulin 和 Insulin 诱导 2d 后,维持培养至 8~10d,油红染色鉴定脂肪细胞。

分别以腺病毒载体 Ad-SIRT1 和 Ad-GFP 感染脂肪细胞,并以未感染病毒的脂肪细胞为阴性对照,以未分化的 3T3-L1 前脂肪细胞为空白对照,72h 后收集细胞上清和裂解细胞分别做 ELISA 和 RT-PCR 检测。

1.2.5 SIRT1 mRNA 及 SIRT1 蛋白表达水平检测 提取细胞 RNA,用 RT-PCR 检测 SIRT1 mRNA 表达水平,按照 SIRT1 ELISA 试剂盒说明书测定标准品及各孔细胞培养上清液中 SIRT1 蛋白含量。以系列浓度 SIRT1 标准品绘制标准曲线,根据标准曲线计算 SIRT1 浓度。

1.2.6 动物饲养及分组 C57BL/6J 小鼠编号,饲以基础饲料,自由饮食,自然光照,动物室温度 18-25℃,相对湿度 40%-70%,适应性喂养一周后随机分为三组:正常对照组 (NC 组) 7 只、高脂喂养组 (HF 组) 9 只、SIRT1 组 (HR 组) 14 只。NC 组饲以普通饲料,HR 组和 HF 组饲以高脂饲料 (成分:65%基础饲料、6%蛋黄、22%熟猪油、7%白砂糖)。十六周后,HR 组静脉注射重组腺病毒,连续两天。

1.2.7 导管植入及胰岛素钳夹术 小鼠禁食 8~10h 后,行苯巴比妥 (50mg/kg) 腹腔麻醉,经右颈外静脉植入一硅胶导管,延伸到右心房。颈动脉导管经左侧颈动脉植入达主动脉弓,管体外部分末端用标准伤夹固定于颈背部皮肤。小鼠术后适应性饲养 3d,空腹 12h 后行高胰岛素-正葡萄糖钳夹技术。术中小鼠可在笼内自由活动。用 2 个微电脑数字式微量注射泵由颈动脉输注 25% 葡萄糖和胰岛素。钳夹术开始后,以 6mU/(kg $\cdot$ min) 的速度连续输注胰岛素,每 5~10min 测定血糖 (BG) 浓度,并调节 25% 葡萄糖输注率 (GIR) 使 BG 维持在 510mmol/L 左右。分别于钳夹术前、后从颈静脉导管抽取血标本双份,分别行促凝分离制备血清样本和 EDTA-K2 抗凝制备全血样本,并用同窝小鼠血补充血容量^[3]。

1.2.8 指标检测 全自动生化分析仪上检测小鼠血清胆固醇、甘油三酯、高密度脂蛋白胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇、游离脂肪酸。流式细胞仪上检测血小板活化指标。

1.2.9 数据分析 实验小鼠 30 只及检测数据均纳入结果分析,无脱失。全部数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 11.0 软件进行统计学分析,组间采用 t 检验。

2 结果

2.1 SIRT1-siRNA 穿梭质粒的构建

采用限制性内切酶 *Kpn* I + *Not* I 双酶切鉴定 pShuttle-U6-SIRT1、GFP 质粒 DNA。结果显示酶切条带为 6.6kb 和 412bp 的两个片段,分别代表 pShuttle 质粒和 U6+ 插入目的片段,与预期结果完全一致。说明 SIRT1-siRNA 表达框已经正确克隆 (图 1),DNA 序列分析也进一步证实了 SIRT1-siRNA 表达框的正确插入。

2.2 重组腺病毒载体的构建

对 2 种重组腺病毒质粒 DNA (pAd-SIRT1 和 pAd-GFP) 采用 *Pac* I 酶切后,所形成 30kb 和 3.0kb 两个片段代表重组发生在左臂,另外 30kb 和 4.5kb 两个片段代表重组发生在复制起始区 (图 2)。

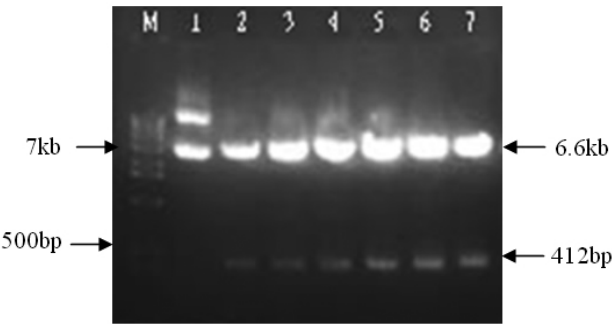


图 1 穿梭质粒 pShuttle-U6-SIRT1 的酶切鉴定

M: DNA marker; 1:重组质粒酶切前 2-6: *Kpn* I 和 *Not* I 双酶切 pShuttle-U6-SIRT1 ; 7: *Kpn* I 和 *Not* I 双酶切 pShuttle-U6-GFP
Fig. 1 Restriction mapping of plasmid pShuttle-SIRT1- siRNA
M: Wide range DNA marker; 1: Recombinant plasmid pShuttle(6.6kb);
2-6: pShuttle-U6-SIRT1 digested by *Kpn* I & *Not* I (412bp);
7 pShuttle-U6-GFP digested by *Kpn* I & *Not* I

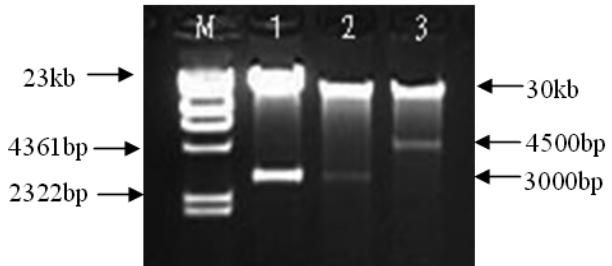


图 2 重组腺病毒质粒(pAd-SIRT1-siRNA)的酶切鉴定

M: λ hindIII digest; 1-2: *Pac* I 酶切 pAd-SIRT1; 3: *Pac* I 酶切pAd-GFP
Fig. 2 Restriction mapping of recombinant plasmid pAd-SIRT1-siRNA;
M: λ hindIII digest, the highest is 23kb; 1-2: pAd - SIRT1 digested by *Pac* I;
3: pAd-GFP digested by *Pac* I

2.5 重组腺病毒对小鼠脂代谢和血小板活化的影响

小鼠血清总胆固醇(TC)、甘油三脂(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、游离脂肪酸(FFA)测定结果见表 1。血小板活化指标 PAC- I、CD62 见表 2。由表可见, HF 组血清胆固醇、甘油三酯、游离脂肪酸和低密度脂蛋白胆固醇显著高于正常对照组 ($P<0.05$), 而在 HR 组上述指标则显著低于 HF 组 ($P<0.05$)。且 HF 组高密度脂蛋白胆固醇显著低于正常对照组 ($P<0.05$), 在 HR 组, 高密度脂蛋白胆固醇则显著高于 HF 组 ($P<0.05$)。血小板活化测定结果显示, 与正常对照组相比, HF 组血小板早期活化程度显著增强 ($P<0.05$), 而 HR 组血小板早期活化程度则比 HF 组显著减弱 ($P<0.05$), 三个组中血小板晚期活化程度无显著性差异 ($P>0.05$)。

表 1 细胞上清液中 SIRT1 浓度

Table1 Concentration of SIRT1 in the culture media ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Groups	Concentration of adiponectin	Inhibition ratio
Ad-SIRT1-1 group	3.58 $\pm$ 0.132*	61%
RNAi control group	6.52 $\pm$ 0.141	--
Normal control group	5.93 $\pm$ 0.136	--
Blank control group	4.34 $\pm$ 0.1	--

Note: * $P<0.05$, vs normal control group

2.3 重组腺病毒的包装和扩增及滴度测定

腺病毒质粒转染 AD293 细胞 5~7d 后即可见明显特征性的细胞病变 (CPE)。细胞变大变圆, 折光性增强, 随后出现串珠样改变直至葡萄簇样改变并从细胞培养板上脱落。正常 AD293 细胞未见上述变化。用空斑形成实验 (Plaque Assay) 测定腺病毒滴度分别为 Ad - SIRT1, 4.5×10^8 ; Ad-GFP, 5.6×10^8 PFU/ml。

2.4 SIRT1-siRNA 重组腺病毒转染对 3T3-L1 脂肪细胞 SIRT1 表达的抑制

分别以重组腺病毒载体 Ad-SIRT1-1 和 Ad-GFP 感染诱导分化成熟的 3T3-L1 脂肪细胞, 用 RT-PCR 分析 SIRT1 mRNA 表达水平。结果表明构建的 SIRT1 siRNA 腺病毒载体能显著抑制脂肪细胞 SIRT1 基因的表达 (图 3)。ELISA 测定细胞上清液中 SIRT1 蛋白含量结果提示被 SIRT1 siRNA 重组腺病毒转染的脂肪细胞 SIRT1 分泌显著低于正常对照组 ($P<0.05$), 见表 1, 抑制率为 61 %。

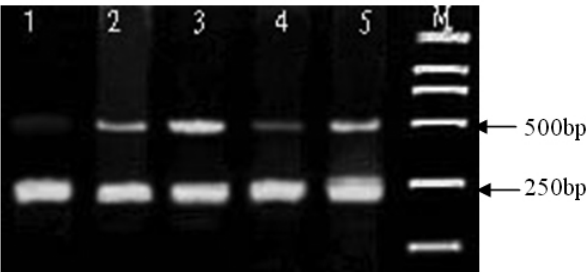


图 3 重组腺病毒载体转染 3T3-L1 脂肪细胞 SIRT1 mRNA 表达
SIRT1 PCR 扩增产物(500bp)和内参 GAPDH PCR 扩增产物 (250bp)
M: DL2000 Maker; 1-2: Ad-SIRT1; 3: Ad-GFP; 4: 空白对照; 5: 阴性对照。

Fig.3 The expression of SIRT1 mRNA in 3T3-L1 adipocytes transfected with adenoviral plasmid.
The fragments of 500bp are for SIRT1 and 250bp for GAPDH. M: DL2000 Maker; 1-2: Ad-SIRT1; 3: Ad-GFP; 4: Non-differentiating 3T3-L1 cells; 5: Negative control.

3 讨论

胰岛素抵抗是众多疾病如 2 型糖尿病、动脉粥样硬化及脂代谢综合症等的重要病因, 胰岛素抵抗机体血清胆固醇、甘油三酯、游离脂肪酸等升高, 亦有研究表明胰岛素抵抗个体血小

板活化增强。高脂饮食诱导的胰岛素抵抗动物模型具有可靠、便捷、成本低的特点,已经广泛应用于胰岛素抵抗发病机制及某些改善胰岛素的药物研究中。高胰岛素 - 正糖钳夹技术是目前公认的评价胰岛素敏感性的金标准,由于在血浆胰岛素的优势浓度下,可完全抑制内源性葡萄糖产生,此时外源性葡萄糖输

注率相当于外周组织的葡萄糖利用率,即可作为评价外周组织胰岛素敏感性的指标。本文利用高脂饮食诱导小鼠胰岛素抵抗,运用高胰岛素正葡萄糖钳夹技术,评价分析胰岛素抵抗小鼠在处理因素干预前后血脂和血小板活化状态。
本实验选择了 PAC-I 和 CD62P 这两种可以反映血小板早

表 1 不同处理组小鼠血脂结果 ($\bar{x} \pm s, n=30$)
Tab.1 The results of mice blood fat in different groups ($\bar{x} \pm s, n=30$)

	TC	TG	HDL-C	LDL-C	FFA
NCgroup	2.0± 0.2	1.0± 0.05	1.8± 0.2	0.3± 0.1	0.51± 0.1
HFgroup	15.1± 0.2*	4.2± 0.1*	0.9± 0.2*	7.2± 0.7*	1.93± 0.2*
HRgroup	4.1± 0.1 [△]	0.8± 0.1 [△]	3.6± 0.1 [△]	0.6± 0.05 [△]	0.43± 0.07 [△]

注 * 与 NC 组比较, $P<0.05$;[△]与 HF 组比较, $P<0.05$
Note *vs NC group, $P<0.05$;[△]vs HF group, $P<0.05$

表 2 不同处理组小鼠血小板活化程度 ($\bar{x} \pm s, n=30$)
Tab.2 The results of mice plate activation in different groups ($\bar{x} \pm s, n=30$)

	PAC-I	CD62
NCgroup	14.43± 1.25	1.28± 0.12
HFgroup	34.15± 1.87*	1.38± 0.12*
HR-Igroup	22.27± 1.53 [△]	1.12± 0.09 [△]

注 * 与 NC 组比较, $P<0.05$;[△]与 HF 组比较, $P<0.05$
Note *vs NC group, $P<0.05$;[△]vs HF group, $P<0.05$

期活化和晚期活化的分子作为观察血小板活化的分子标志物。PAC-I 即活化的 GPIIb/IIIa 复合物,主要是纤维蛋白原受体,其主要功能是与纤维蛋白原 Fg 结合,通过 Fg 的桥梁作用把血小板与血小板之间、血小板与血管内皮下成分连接起来形成血小板血栓。未活化血小板即存在 GPIIb/IIIa,但藏于血小板膜内侧,不能与 Fg 结合。血小板活化时,藏于血小板膜内侧 GPIIb/IIIa 首先暴露于血小板表面,成为血小板活化的早期标志物。CD62P 即 GM-140,静寂时选择性地分布在血小板胞浆内的 α -颗粒上,血小板活化时, α 颗粒迅速与血小板膜融合并向膜外释放,使血小板表面高度表达 CD62P。因此,CD62P 已成为目前最具特异性血小板晚期活化标志物^[4-8]。本文结果显示, HF 组血小板活化标志物 PAC-I 阳性表达率显著增高,与正常对照组比较有显著意义 ($P<0.05$),表明高脂饮食所致胰岛素抵抗个体体内血小板早期高度激活。过去判断体内血小板活化程度往往采用 ELISA 或放射免疫法测定血小板的释放产物如 β -TG、PF4 及血小板花生四烯酸的代谢产物如 TXA4、PGI2 的含量变化或测定胞浆、血小板膜上的 GMP-140 数,但其标本制备比较困难,易受体内外多种因素影响,特异性低,不能准确地反映体内血小板的活化程度,应用流式细胞仪技术 FCM 和经荧光标记的单克隆抗体 McAb 测定血小板膜糖蛋白克服了以前测定方法上的缺陷,简便、快速、灵敏、特异,是测定血小板活化的有效方法^[9-11]。

本课题根据 siRNAs 的设计原则^[12-14],设计了 2 个编码小鼠 SIRT1 基因的特异性 siRNA 寡核苷酸插入片断,并将其亚克隆

入穿梭质粒 pShuttle-U6,用 *Pme* I 酶切线性化穿梭质粒,并与骨架质粒 pAdeasy-1 在 BJ5183 细胞内同源重组,最后在 293 细胞内包装为重组腺病毒。将上述重组腺病毒感染诱导分化后的 3T3-L1 脂肪细胞,证明此 siRNA 寡核苷酸片断抑制 SIRT1 表达有效,将此重组腺病毒载体命名为 Ad-SIRT1。将其感染胰岛素抵抗模型小鼠,能降低其血脂,抑制其血小板活化。
本实验采用的 AdEasy™ XL 腺病毒载体系统是目前基因治疗中应用最广泛的一种载体系统,具有许多优点,如转染效率高,感染的宿主范围广,可以有效地转染分裂和静止期细胞,载体容量大,插入外源基因片断长,目的基因的蛋白在哺乳动物细胞中的表达水平较高,而且携带基因不整合到宿主细胞基因组中,对机体的安全性较高^[15]。本研究中,我们将携带有腺病毒骨架质粒的大肠杆菌 BJ5183 感受态细胞作为重组穿梭质粒载体转化的宿主菌,大大提高了同源重组的效率,在空斑形成实验中测定到了较高的病毒滴度。最后,将上述带有 SIRT1-siRNA 表达框的重组腺病毒 (Ad-SIRT1) 转染入诱导分化后的 3T3-L1 脂肪细胞,并观察了其对 SIRT1 表达的抑制效应。结果表明脂肪细胞 SIRT1mRNA 和蛋白表达均受到明显抑制,其抑制率为 61%,提示本研究设计的 SIRT1-siRNA 寡核苷酸片断能有效阻断 3T3-L1 脂肪细胞 SIRT1 基因的表达。本研究同时将其感染胰岛素抵抗模型小鼠,能降低其血脂,抑制其血小板活化。因此,可以认为 SIRT1-siRNA 重组腺病毒载体质粒的构建为研究 SIRT1 与肥胖和胰岛素抵抗的发病机制之间的关系提供了一个高效、经济的技术平台。

参考文献(References)

- [1] McGarry JD. Dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes[J]. Diabetes, 2002, 51(1): 7-18
- [2] Jukka W, Hannele YJ, Anu T, et al. Inhibition of Platelet-Collagen Interaction: An In Vivo Action of Insulin Abolished by Insulin Resistance in Obesity [J]. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2002, 22(7): 167-175
- [3] Cheng Sun, Fang Zhang, Xinjian Ge. SIRT1 Improves Insulin Sensitivity[J]. Cell Metabolism, 2007, 6 (4): 307-319
- [4] Haouari M, Rosado JA. Platelet signalling abnormalities in patients with type 2 diabetes mellitus [J]. Blood Cells Mol Dis, 2008, 41: 119-123
- [5] Ferroni P, Basili S, Falco A, Davi G. Platelet activation in type 2 diabetes mellitus[J]. J Thromb Haemost, 2004, 1282-1291
- [6] Watala C, Golanski J, Pluta J, et al. Reduced sensitivity of platelets from type 2 diabetic patients to acetylsalicylic acid (aspirin): its relation to metabolic control[J]. Thromb Res, 2004, 11(3): 101-113
- [7] Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E, et al. Is a 300 mg clopidogrel loading dose sufficient to inhibit platelet function early after coronary stenting? A platelet function profile study[J]. J Invasive Cardiol, 2004, 11(6): 325-329
- [8] Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E, et al. Role of the 807 C/T polymorphism of glycoprotein Ia/IIa on platelet function following clopidogrel loading-dose in patients undergoing coronary stenting[J]. Blood Coagul Fibrinolysis, 2004, 15: 427-433
- [9] Marx N, Imhof A, Froehlich J, et al. Effect of rosiglitazone treatment on soluble CD40L in patients with type 2 diabetes and coronary artery disease[J]. Circulation, 2003, 10(7): 1954-1957
- [10] Boden G, Homko C, Mozzoli M, et al. Thiazolidinediones upregulated fatty acid uptake and oxidation in adipose tissue of diabetic patients [J]. Diabetes, 2005, 54: 880-885
- [11] Tutar E, Ozcan M, Kilickap M, et al. Elevated whole-blood tissue factor procoagulant activity as a marker of restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty and stent implantation [J]. Circulation, 2003, 10(8): 1581-1584
- [12] Harborth J, Elbashir SM, Vandenburgh K, et al. Sequence, chemical and structural variation of small interfering RNAs and short hairpin RNAs and the effect on mammalian gene silencing[J]. Antisense Nucleic Acid Drug Dev, 2003, 13: 83-105
- [13] Semizarov D, Frost L, Sarthy A, et al. Specificity of short interfering RNA determined through gene expression signatures[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100: 6347-6352
- [14] Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, et al. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi [J]. Nat Biotechnol, 2003, 21: 635-637
- [15] Sun XG, Song G, Liu JH, et al. Construction of plasmid vector with Tat and its ability to transduce fusion protein into cells [J]. Chin J Biochem Mol Biol, 2003, 19: 354-358

(上接第 297 页)

参考文献(References)

- [1] Caldemeyer KS, Harris TM, Smith RR, et al. Gadolinium enhancement in acute disseminated encephalomyelitis[J]. Computer Assist Tomogr, 1991, 15(4): 673-675
- [2] Kanter DS, Horensky D, Sperling RA, et al. Plasmapheresis in fulminant acute disseminated encephalomyelitis [J]. Neurology, 1995, 45 (4): 824-827
- [3] Murrthy JMK. A cute disseminated encephalomyelitis [J]. Neurology, 2002, 50: 238-243
- [4] 吴恩惠. 脑变性疾病和脱髓鞘疾病[J]. 临床放射学杂志, 1999, 18(2): 119-121
Wu En-hui. Cerebral degeneration and demyelinating diseases[J]. Journal of clinical Radiology, 1999, 18(2): 119-121
- [5] Murthy SNK, Faden HS, Cohen ME, et al. Acute disseminated encephalomyelitis in children[J]. Pediatrics, 2002, 110: 1-7
- [6] Poh ID. Epidemiology, immunopathogenesis and management of pediatric central nervous system inflammatory demyelinating conditions [J]. Curr Opin Neurol, 2008, 21(3): 366-372
- [7] Mader I, Stock KW, Ettlin T, et al. Acute disseminated encephalomyelitis: MRI and CT features[J]. AJNR, 1996, 17: 104-109
- [8] Kanter DS, Horensky D, Sperling RA, et al. Plasmapheresis in fulminant acute disseminated encephalomyelitis[J]. 1995, 45(4): 824-827
- [9] 邓利猛, 王小宜, 廖伟华, 等. 急性播散性脑脊髓炎的 MRI 表现及临床分析[J]. 放射学实践, 2004, 19(8): 570-573
Deng Li-meng, Wang Xiao-yi, Liao Wei-hua, et al. MRI findings and clinical of acute disseminated encephalomyelitis [J]. Radiol Practice, 2004, 19(8): 570-573
- [10] 魏岗之, 袁锦楣, 张津. 神经系统脱髓鞘性疾病[M]. 人民军医出版社, 北京, 2003, 163
Wei Gang-zhi, Yuan Jin-mei, Zhang Jin. The nervous system demyelinating sexual diseases [M]. People's Military Medical Publisher, Bei-jing, 2003, 163
- [11] 马林, 于生元, 蔡幼铨, 等. 急性播散性脑脊髓炎的脑部 MRI 表现[J]. 中华放射学杂志, 2000, 34(8): 515-517
Ma Lin, Yu Sheng-yuan, Cai You-quan, et al. MR imaging of the brain in acute disseminated encephalomyelitis[J]. Chin Radiol, 2000, 34(8): 515-517
- [12] Khong PL, Ho HK, Cheng PW, et al. Childhood acute disseminated encephalomyelitis: the role of brain and spinal cord MRI[J]. Pediatr Radiol, 2002, 32: 59-66
- [13] Herrero T, Barcia C, Navarro JM. Functional anatomy of thalamus and basal ganglia [J]. Child Nerv Syst, 2002, 18(8): 386-404
- [14] 戴景儒, 戴世鹏, 庞军. DWI 鉴别诊断病毒性脑炎与急性播散性脑脊髓炎[J]. 中国医学影像技术, 2008, 24(10): 1561-1564
Dai Jing-ru, Dai Shi-peng, Pang Jun. DWI in differential diagnosis between viral encephalitis and acute disseminated encephalomyelitis[J]. Chin J Med Imaging Technol, 2008, (10): 1561-1564
- [15] Bizzi A, Ulu AM, Crawford TO, et al. Quantitative proton MR spectroscopic imaging in acute disseminated encephalomyelitis [J]. AJNR, 2001, 22: 1125-1130