

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.02.011

线粒体蛋白运输能力测定工具建立*

杨峰 孙文娟 刘丽丽 杜德伟 孙脊峰[△]

(第四军医大学唐都医院肾脏内科 陕西 西安 710038)

摘要 目的:克隆 SLC25A6 基因入 pcDNA3.0 表达载体中,同时给基因两端加入 HA 和 Myc 标签,为探索 SLC25A6 基因作为工具研究线粒体生物合成作用在急性肾损伤产生机制提供基础。**方法:**根据 NCBI 人 SLC25A6 mRNA 序列设计引物,通过酶切连接反应将 SLC25A6 插入到 pcDNA3.0 中,成功构建 pcDNA3.0-1xHA-SLC25A6-1xMyc 后,经酶切和测序验证正确后,将重组表达质粒转染入人 Hela 细胞,通过 Western-Blot 验证重组质粒的表达情况。**结果:**pcDNA3.0-1xHA-SLC25A6-1xMyc 表达质粒测序比对完全正确,转染 Hela 细胞后可见明显的表达条带。**结论:**成功构建了 N 端带有 HA tag, C 端带有 Myc tag 的 SLC25A6 基因表达载体 pcDNA3.0-1xHA-SLC25A6-1xMyc,通过转染 Hela 细胞证明其能正确表达,为研究 SLC25A6 作为线粒体生物合成能力的监测工具探索线粒体在急性肾损伤中的机制奠定了基础。

关键词:SLC25A6;线粒体;急性肾损伤

中图分类号:R-33; Q75; R692 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)02-247-05

Construction a Tool to Monitor Mitochondrial Import Ability*

YANG Feng, SUN Wen-juan, LIU Li-li, DU De-wei, SUN Ji-feng[△]

(Department of Nephrology, TangDu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710038, China)

ABSTRACT Objective: In order to clone human SLC25A6 into vector pcDNA3.0, and add HA tag to the N terminal, Myc tag to the C terminal respectively, lay the foundation for further study of SLC25A6 as a tool to monitor the mitochondrial import ability. **Methods:** The PCR primers were designed based on the SLC25A6 mRNA sequence deposited in NCBI and then they were digested by double restriction enzymes and inserted into vector pcDNA3.0. After verification by digestion and sequencing, the constructed plasmid pcDNA3.0-1xHA-SLC25A6-1xMyc was transfected into human Hela cells. SLC25A6 expression was verified by Western-blot. **Results:** The cloned recombination plasmid as tool pcDNA3.0-1xHA-SLC25A6-1xMyc was confirmed by enzyme digestion and DNA sequencing. SLC25a6 gene can be successfully expressed in human Hela cells. **Conclusion:** Human SLC25A6 tagged with HA in N terminal and Myc in C terminal respectively pcDNA3.0-1xHA-SLC25A6-1xMyc were successfully cloned, and it was well expressed in Hela cells, which provides basic tools for the following studies about SLC25A6 as a tool to monitor mitochondrial import ability and study mitochondrial crucial role in acute kidney injury.

Key words: SLC25A6; Mitochondrion; Acute kidney injury

Chinese Library Classification(CLC): R-33; Q75; R692 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)02-247-05

前言

急性肾损伤(Acute Kidney Injury, AKI)是一种高致死性和高发病率的临床常见病,也是慢性肾脏疾病的重要发病原因。主要表现为肾小球过滤能力的显著降低^[1-3]。虽然目前已经发现如,肾小球血管灌注降低,药源性,手术诱发,或者败血症等可能是急性肾损伤的发病原因,但目前对其发病机理不是很清楚,也没有有效的治疗肾损伤的药物存在^[4,5]。

越来越多的证据表明线粒体的功能异常是导致急性肾损伤的主要原因,目前对线粒体功能的研究,如线粒体生物合成作用,线粒体的融合和分裂作用以及线粒体的自噬作用的研究暗示线粒体在急性肾损伤的重要作用及作为药物靶点治疗急

性肾损伤的可能性^[6-8]。许多线粒体的代谢异常导致肾脏相关的病理改变^[9,10],如,辅酶 Q 的生物合成作用受阻或线粒体 DNA 的突变是儿童和成人中局灶性肾小球硬化症的主要发病机制。在急性肾损伤中,线粒体的功能在组织损伤中起到了非常重要的作用,恢复线粒体的生物功能可能是肾脏功能恢复的重要药物靶点^[11,12]。

正常的线粒体运输蛋白进入和运出线粒体的功能对于线粒体是非常关键的,在线粒体上存在多种复合物来调节物质的运输,如在线粒体外膜存在 TOM 复合物,内膜存在 TIM 复合物,而这些复合物存在不同的组装原件和亚基,在细胞核内生成的前体蛋白需要通过线粒体的正常运输才能正确的组装到相应的亚线粒体部位发挥作用,而这些运输通道的功能正常发

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81400690)

作者简介:杨峰(1975-),主治医师,主要研究方向:急性肾损伤机制,电话:13572088386

△ 通讯作者:孙脊峰,电话:029-84777424, E-mail: jifeng-sun@medmail.com.cn

(收稿日期:2016-07-27 接受日期:2016-08-19)

对于线粒体在细胞内的功能发挥是非常重要的,其异常会导致细胞毒性甚至细胞凋亡的发生。线粒体被称为是细胞内的'能量工厂',细胞代谢需要的大量的 ATP 需要线粒体通过氧化磷酸化途径合成,而这些 ATP 需要通过线粒体膜上的 ADP/ATP 载体蛋白 SLC25A6 的正确运输,才能到细胞质内发挥作用,SLC25A6 又称为 ADP/ATP 转移酶 3,是一种可溶性的膜转运载体蛋白,其在细胞内的正确组装直接影响细胞内 ATP 的水平和线粒体内其他蛋白质的运输和正确组装,其突变将导致许多疾病,如细胞毒性,癌症,败血症等^[13,14]。

本研究拟根据 SLC25A6 蛋白的 ATP 运输特点,构建检测线粒体蛋白运输能力检测工具 pcDNA3.0-1xHA-SLC25A6-1xmyc,通过此在细胞内的成熟形式和前体蛋白的量变化,实时监测线粒体物质运输能力的变化,研究线粒体生物合成作用在急性肾损伤中的作用机理。

1 材料和方法

1.1 材料

Hela 细胞, *E.coli* DH5 α 菌株和 pcDNA3.0 质粒均为本室保存, SLC25A6 基因为本实验室真核生物基因库中保存基因, PrimerStar DNA 聚合酶, DNA Marker, *EcoRI* 和 *XhoI* DNA 限制性内切酶均购自于 TakaRa 公司, 小量质粒提取试剂盒, DNA 胶回收试剂盒均购于 Axygen 公司, SDS-PAGE 所用蛋白 Marker 购于 Invitrogen 公司。Western blot 所用一抗 ERK 抗体购于 Santa Cruz 公司, HRP 标记的羊抗鼠 IgG 购于 Odyssey 公司, 抗 HA 和抗 Myc 抗体均购自 Cell signaling 公司, 转染所用试剂盒 Lipofectamine2000 购自 Life technologies。

1.2 方法

1.2.1 引物设计, 合成及 PCR 扩增 依据 NCBI SLC25A6 mRNA 序列进行引物设计, 用 Primer Premers5 软件进行设计引物, 在设计引物时, 上下游分别加入 *EcoRI* 和 *XhoI* 酶切位点, 引物由 Invitrogen 公司合成。合成后引物稀释成 10 μ M 后进行 PCR, 反应体系为 sense oligo 1 μ L, antisense oligo 1 μ L, 5x PrimerSTAR Buffer 10 μ L, PrimerSTAR HS DNA Polymerase (2.5 U/ μ L) 0.5 μ L, 模板 2 μ L, dNTP Mixture 4 μ L, 灭菌水 31.5 μ L。反应条件为 98 $^{\circ}$ C 10 sec, 58 $^{\circ}$ C 45 sec, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 35 个循环。上游引物加入 *EcoRI* 酶切位点和在起始密码子 ATG 后加 1xHA 标签, 序列为: 5'-ccgGAATTCgccaccatgtaccatagatgttcagattacgctatgacggaacagggccatctct-3', 下游引物加入 *XhoI* 酶切位点, 及在 SLC25A6 后加 1xmyc 序列, 引物序列为: 5'-ccgCTCGAGttcatcgaagtcctctcagaaatgagcttttgctgatcacctcttgagc tcgtcgt-3'。

1.2.2 PCR 扩增 SLC25A6 用 PrimerSTAR DNA 聚合酶扩增 SLC25A6 基因, PCR 结束后进行胶回收, 纯化含有酶切位点的 SLC25A6 PCR 产物。

1.2.3 空载体和 PCR 产物双酶切 取经过胶回收纯化的 PCR 产物 1 μ g, 和空载体 pcDNA3.0 1 μ g 同时进行双酶切, 每个体系中分别加入 *EcoRI* 和 *XhoI* 各 1 μ L, 10 $\times$ H buffer 各 2 μ L, 补水至 20 μ L 后在 37 $^{\circ}$ C 培养箱酶切 3 h, 酶切结束后进行琼脂糖凝胶电泳纯化酶切片段。

1.2.4 阳性克隆的鉴定 挑取阳性克隆 5 株, 经扩增后小量提

取质粒后进行双酶切鉴定。

1.2.5 阳性克隆测序鉴定 将酶切鉴定正确的克隆挑选一株进送 Invitrogen 公司测序。

1.2.6 免疫印迹检测蛋白表达 接种人 Hela 细胞于 10 cm 皿上, 将 4 μ g 质粒 DNA 和 Lipofectamine2000 转染试剂 8 μ L 分别和无血清 DMEM 培养基混合于 250 μ L 中, 室温静置 5 min, 混匀后静置 20 min, 加入提前铺好的细胞中, 在 37 $^{\circ}$ C, 5 %的 CO₂ 下恒温培养培养 24 h。提取蛋白, 制样, HA, Myc, ERK 抗体 1:1000 稀释, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜后于二抗结合后曝光检测 SLC25A6 蛋白表达情况。

2 结果

2.1 pcDNA3.0-1xHA-SLC25A6-1xMyc 重组载体的构建

2.1.1 PCR 扩增 SLC25A6 基因 经 PCR 加入 *EcoRI* 和 *XhoI* 酶切位点, 以及 HA 和 Myc 标签至 SLC25A6 基因两端, PCR 后进行 DNA 琼脂糖凝胶电泳纯化 PCR 产物, 可观察到 8 个 PCR 管均可见约 900 bp PCR 产物(图 1)。

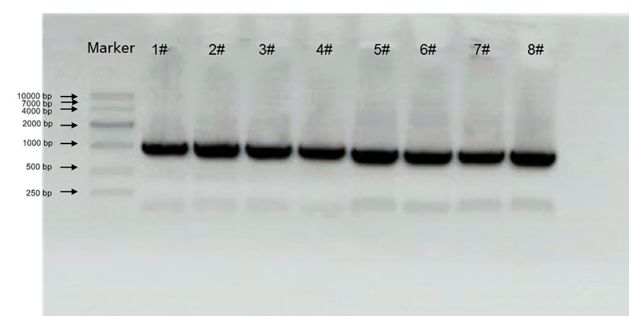


图 1 SLC25A6 PCR 扩增结果

Fig.1 PCR amplification result of SLC25A6

2.1.2 空载体与 PCR 产物双酶切预处理 空载 pcDNA3.0 和 PCR 产物经 *EcoRI* 和 *XhoI* 双酶切后的产物进行 DNA 电泳, 可以检测到约 5.4 kb 大小 pcDNA3.0 条带和约 0.9 kb 的 SLC25A6 条带, 从结果可以看出, 酶切成功(图 2)。

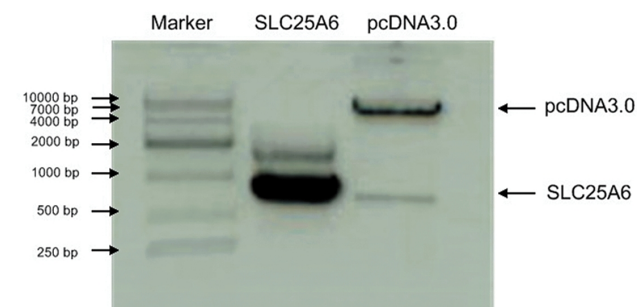


图 2 SLC25A6, pcDNA3.0 双酶切产物

Fig.2 Products of pcDNA3.0 plasmid and SLC25A6 fragment restriction enzyme double Digestion

2.1.3 重组载体 pcDNA3.0-1xHA-SLC25A6-1xMyc 阳性克隆的挑选 将酶切后的产物分别进行 DNA 琼脂糖凝胶电泳, 连接, 转化后挑选 5 个克隆进行小量 DNA 提取和酶切鉴定, 从结果中可见 5 个克隆中有 4 个为阳性克隆, 可见约 900 bp 条带(图 3)。

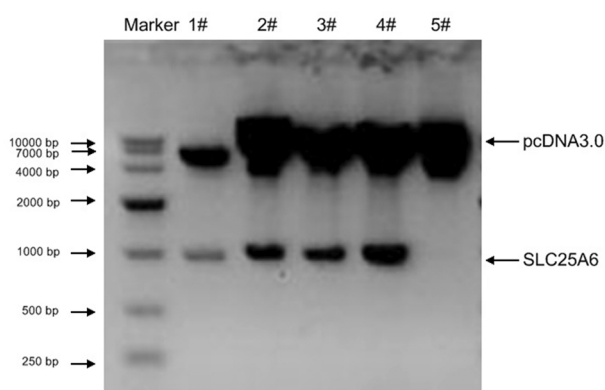


图3 重组入门质粒 pcDNA3.0-1xHA-SLC25A6-1xMyc 阳性克隆挑选
Fig.3 Positive clones of pcDNA3.0-1xHA-SLC25A6-1xMyc

2.1.4 阳性克隆测序验证 挑取 1 个 pcDNA3.0-1xHA-SLC25A6-1xMyc 阳性克隆送 Invitrogen 公司测序,测序结果经与 NCBI 上传序列比对,可见 HA 标签,MyC 标签及 SCL25A6 基因已经成功插入到 pcDNA3.0 空载中,该工具构建成功(图 4)。

2.2 pcDNA3.0-1xHA-SLC25A6-1xMyc 表达检测

将构建好的质粒 pcDNA3.0-1xHA-SLC25A6-1xMyc 经 Lipofectamine 2000 转染 Hela 细胞 24 h 后,用 NP40 裂解细胞收集蛋白,检测蛋白表达情况。结果显示,该蛋白成功表达,且当 SLC25A6 蛋白被成功运输到线粒体膜内时,可检测到成熟形式的 SLC25A6 蛋白,而同时在细胞中仍然可以检测到 SLC25A6 蛋白的前体蛋白(图 5)。

3 讨论

急性肾损伤是一类高致病性和高致死率的疾病,然而目前对其发病机制还不是很清楚,急需需要治疗急性肾损伤的有效方法,大量研究表明,急性肾损伤与线粒体的功能异常密切相关,肾小管,尤其是近端小管细胞含有大量的线粒体,这些线粒体是通过氧化磷酸化维持细胞 ATP 的正常水平,从而保证肾脏的正常过滤作用。缺血再灌注损伤,药物毒性和败血症等均会导致近端小管细胞线粒体的损伤。患有遗传性线粒体疾病的儿童其主要症状是肾脏具有范可尼特征,另外,许多肾脏疾病,如糖尿病肾病,肾病综合症都存在线粒体功能的损害^[15-18]。

线粒体从细菌而来,是高度复杂的细胞器,存在双层膜,内膜存在大量的脊,线粒体在细胞内发挥重要作用,如大分子的

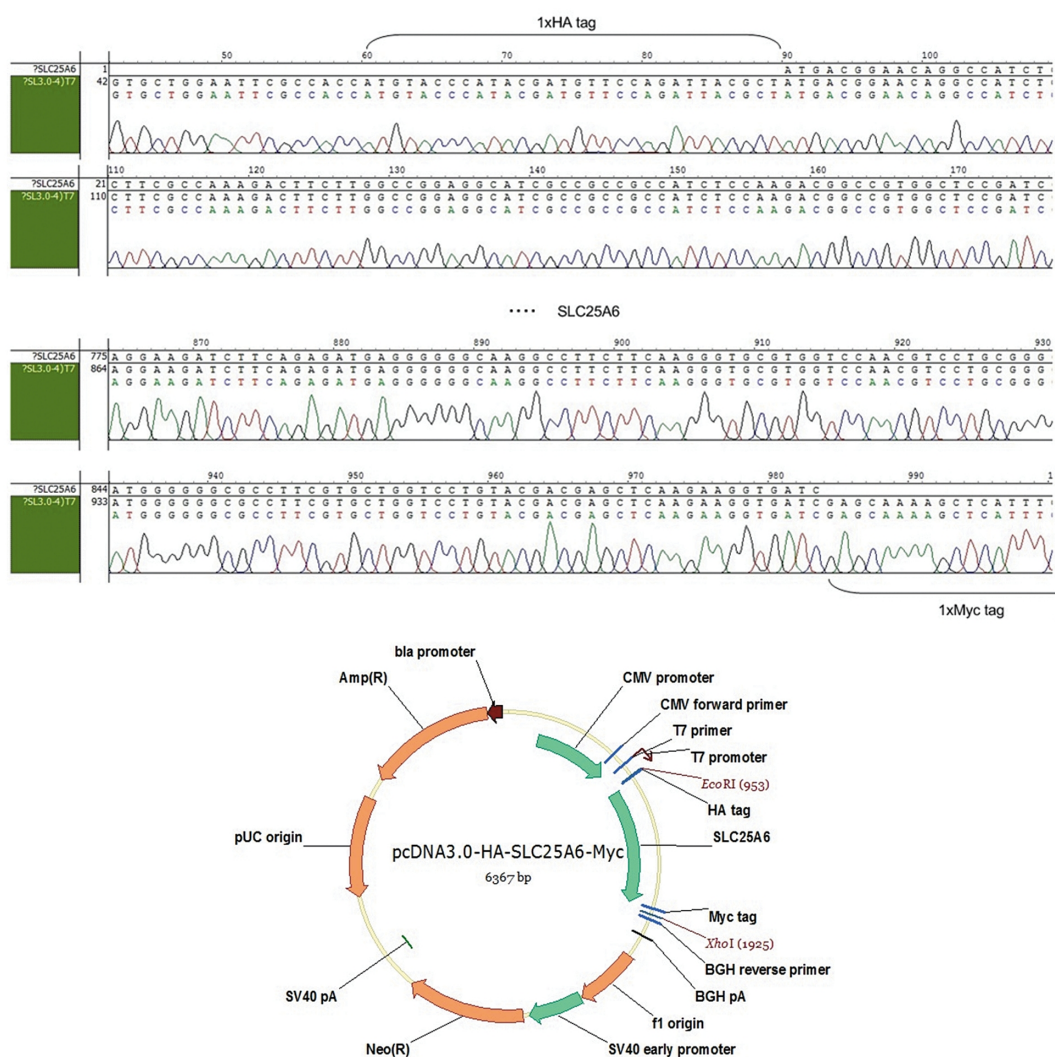


图4 pcDNA3.0-1xHA-SLC25A6-1xMyc 阳性克隆测序结果和质粒图谱

Fig.4 Sequencing result and plasmid map of pcDNA3.0-1xHA-SLC25A6-1xMyc positive colony

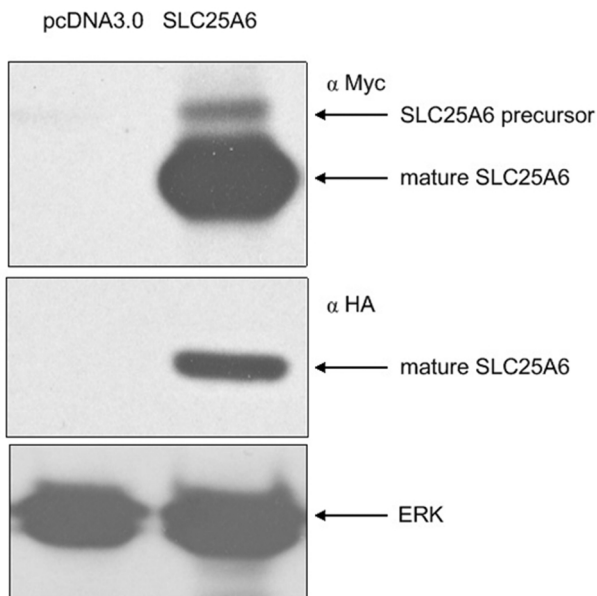


图5 表达质粒 pcDNA3.0-1xHA-SLC25A6-1xMyc Western blot 结果

Fig.5 Verification of pcDNA3.0-1xHA-SLC25A6-1xMyc plasmid expression: Western blot result

生物合成作用,调节细胞凋亡过程,参与调节胞内 Ca^{2+} 的平衡等作用,同时,线粒体也是细胞内大量 ROS 产生的主要原因,也是导致细胞基因组不稳定性的原因。线粒体功能的损害对细胞产生毒性,甚至细胞凋亡,越来越多的证据发现败血症急性肾损伤伴有严重的线粒体损伤,在药物如异环磷酰胺,顺铂,替诺福韦,庆大霉素等引起的急性肾损伤中也存在线粒体的损伤^[19-22],同时,研究表明,在心脏手术引起的急性肾损伤中发现尿液中线粒体 DNA 的升高。线粒体是高度动态的细胞器,存在形态的改变,如通过融合和分裂来交换线粒体基因和代谢产物,线粒体分裂是凋亡因子如细胞色素 C 从线粒体释放到细胞质的重要步骤,在小鼠试验中发现,参与线粒体分裂的分子 DRP1 迅速被招募到近端小管细胞分裂的线粒体部位,用药物或者基因手段阻止 DRP1 的活性使线粒体融合能力显著增加,能有效防止细胞凋亡的发生和防止肾脏损伤,DRP1 抑制剂 Mdivi-1 能防止多种器官的损伤。在急性肾损伤患者标本中可见明显的管细胞的损伤和线粒体自噬途径的异常,线粒体自噬途径是细胞有效清除功能异常的主要途径,而细胞需要通过生物再合成和线粒体融合和分裂的方式保证细胞内正常的线粒体数目,改善参与线粒体生物合成的主要分子的功能能显著改善急性肾损伤的恢复^[25]。PGC-1 α 是调节线粒体生物合成过程的关键激活辅因子,急性肾损伤患者肾皮质细胞表现为明显的 PGC-1 α 表达降低,而在急性肾损伤恢复期,当需要线粒体生物合成提高时,其表达量明显增高,AMPK 是 PGC-1 α 上游激活因子,是重要的能量代谢开关,当细胞内 ATP 急剧下降时,其能有效提高细胞代谢水平,用药物激活 AMPK 能有效保护肾脏损伤^[26,27]由此可见,线粒体功能在多种原因所致的急性肾损伤中发挥重要作用,是主要的潜在的靶向治疗急性肾损伤的可能靶标^[23,24]。

在研究线粒体对急性肾损伤中的作用,传统的方法会用到染料或者需要破碎细胞^[28-31],不能很好的真实反应细胞内线粒

体的功能。如 L. Jay Stallons 等用叶酸诱导小鼠产生急性肾损伤模型,通过检测血清肌酸肝,尿糖,或者通过检测细胞内 PGC-1 α 的 mRNA 水平的变化来反应线粒体的生物合成作用^[28],不能客观直接反应细胞内线粒体的代谢情况,因此需要一种能直接,实时检测线粒体自身代谢能力,如蛋白质的运输能力强弱,药物对线粒体的影响,甚至可以检测单细胞内线粒体的代谢能力强弱的工具。

在我们的研究中,我们构建了重组表达载体 pcDNA3.0-1xHA-SLC25A6-1xMyc,作为工具检测线粒体的蛋白运输能力,根据其成熟过程中的一些特点构建了此工具,一方面可以用免疫荧光的方法实时检测细胞内 SLC25A6 蛋白的运输多少,另一方面,根据此蛋白在线粒体内成熟的模式,根据 Western Blot 可以定量分析其代谢情况,反应线粒体的生物合成作用的强弱,该工具在 N 端和 C 端带有不同的标签,而在蛋白生物合成中,细胞核内生成的 SLC25A6 蛋白前体通过 TOM 等复合物运输到线粒体正确部位,然后经过生物剪切作用去除信号肽,完成蛋白的正确运输和组装过程,在这一过程中,通过在蛋白的两端分别加标签,由于带有信号肽的一段被切除而可区分出成熟形式和蛋白前体两种形式的蛋白,这样可直接甚至在单个细胞内观察线粒体蛋白质运输和生物合成能力的强弱,给我们后续阐明线粒体的生物合成作用在急性肾损伤中的重要作用奠定了基础。

参考文献(References)

- [1] Xue FS, Liu GP, Li RP, et al. Re: Acute kidney injury in major gynaecological surgery: an observational study [J]. BJOG, 2016, 123 (7): 1234-1235
- [2] Villa G, Katz N, Ronco C. Extracorporeal Membrane Oxygenation and the Kidney[J]. Cardioresenal Med, 2015, 6(1): 50-60
- [3] Wybraniec MT, Mizia-Stec K. Renalase and Biomarkers of Contrast-Induced Acute Kidney Injury [J]. Cardioresenal Med, 2015, 6 (1): 25-36
- [4] Kimmel M, Shi J, Wasser C, et al. Urinary [TIMP-2]·[IGFBP7] - Novel Biomarkers to Predict Acute Kidney Injury [J]. Am J Nephrol, 2016, 43(5): 375-382
- [5] Meola M, Nalesso F, Petrucci I, et al. Clinical Scenarios in Acute Kidney Injury: Pre-Renal Acute Kidney Injury [J]. Contrib Nephrol, 2016, 188: 21-32
- [6] Abogresha NM, Greish SM, Abdelaziz EZ. Remote effect of kidney ischemia-reperfusion injury on pancreas: role of oxidative stress and mitochondrial apoptosis[J]. Arch Med Sci, 2016, 12(2): 252-262
- [7] Kaushal GP, Shah SV. Autophagy in acute kidney injury [J]. Kidney Int, 2016, 89(4): 779-791
- [8] Waseem M, Kaushik P, Parvez S. Mitochondria-mediated mitigatory role of curcumin in cisplatin-induced nephrotoxicity[J]. Cell Biochem Funct, 2013, 31(8): 678-684
- [9] Lankadeva YR, Kosaka J, Evans RG, et al. Intrarenal and urinary oxygenation during norepinephrine resuscitation in ovine septic acute kidney injury[J]. Kidney Int, 2016, 90(1): 100-108
- [10] Parajuli N, MacMillan-Crow LA. Role of reduced manganese superoxide dismutase in ischemia-reperfusion injury: a possible trigger for autophagy and mitochondrial biogenesis?[J]. Am J Physiol

- Renal Physiol, 2013, 304(3): F257-267
- [11] Small DM, Gobe GC. Cytochrome c: potential as a noninvasive biomarker of drug-induced acute kidney injury [J]. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2012, 8(6): 655-664
- [12] Parikh SM. Therapeutic targeting of the mitochondrial dysfunction in septic acute kidney injury[J]. Curr Opin Crit Care, 2013, 19(6): 554-559
- [13] Cl  men  on B, Babot M, Tr  z  guet V. The mitochondrial ADP/ATP carrier (SLC25 family): pathological implications of its dysfunction[J]. Mol Aspects Med, 2013, 34(2-3): 485-493
- [14] Yang L, He Y, Kong Q, et al. Isolation, nucleotide identification and tissue expression of three novel ovine genes-SLC25A4, SLC25A5 and SLC25A6[J]. Mol Biol Rep, 2010, 37(6): 2743-2748
- [15] Pathak E, MacMillan-Crow LA, Mayeux PR. Role of mitochondrial oxidants in an in vitro model of sepsis-induced renal injury [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2012, 340(1): 192-201
- [16] Aksu U, Demirci C, Ince C. The pathogenesis of acute kidney injury and the toxic triangle of oxygen, reactive oxygen species and nitric oxide[J]. Contrib Nephro, 2011, 174: 119-128
- [17] Patil NK, Parajuli N, MacMillan-Crow LA. Inactivation of renal mitochondrial respiratory complexes and manganese superoxide dismutase during sepsis: mitochondria-targeted antioxidant mitigates injury[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2014, 306(7): F734-743
- [18] Che R, Yuan Y, Huang S. Mitochondrial dysfunction in the pathophysiology of renal diseases [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2014, 306(4): F367-378
- [19] Gomez H, Ince C, De BD, et al. A unified of sepsis-induced acute kidney injury: Inflammation, microcirculatory dysfunction, bioenergetics, and the tubular cell adaptation to injury[J]. Shock, 2014, 41: 3-11
- [20] Izzedine H, Launary-Vacher V, Isnard-Bagnis. Drug -induced Fanconi's syndrome[J]. Am J Kidney Dis, 2003, 41: 292-309
- [21] Hall AM. Update on tenofovir toxicity in the kidney [J]. Pediatr Nephrol, 2013, 28(7): 1011-1023
- [22] Zsengell  r ZK, Ellezian L, Brown D, et al. Cisplatin nephrotoxicity involves mitochondrial injury with impaired tubular mitochondrial enzyme activity[J]. J Histochem Cytochem, 2012, 60(7): 521-529
- [23] Takahashi A, Kimura T, Takabatake Y, et al. Autophagy guards against cisplatin-induced acute kidney injury [J]. Am J Pathol, 2012, 180(2): 517-525
- [24] Xiao X, Hu Y, Quir  s PM, et al. OMA1 mediates OPA1 proteolysis and mitochondrial fragmentation in experimental models of ischemic kidney injury[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2014, 306(11): F1318-1326
- [25] Thuillier R, Hauet T. Role of translocator protein in renal ischemia reperfusion, renal preservation and acute kidney injury [J]. Curr Mol Med, 2012, 12(4): 413-425
- [26] Funk JA, Schnellmann RG. Persistent disruption of mitochondrial homeostasis after acute kidney injury[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2012, 302(7): F853-864
- [27] Tran M, Parikh SM. Mitochondrial biogenesis in the acutely injured kidney[J]. Nephron Clin Pract, 2014, 127(1-4): 42-45
- [28] Stallons LJ, Whitaker RM, Schnellmann RG. Suppressed mitochondrial biogenesis in folic acid-induced acute kidney injury and early fibrosis[J]. Toxicol Lett, 2014, 224(3): 326-332
- [29] Funk JA, Schnellmann RG. Accelerated recovery of renal mitochondrial and tubule homeostasis with SIRT1/PGC-1   activation following ischemia-reperfusion injury [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2013, 273(2): 345-354
- [30] Funk JA, Schnellmann RG. Persistent disruption of mitochondrial homeostasis after acute kidney injury[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2012, 302(7): F853-864
- [31] Tran M, Tam D, Bardia A, et al. PGC-1   promotes recovery after acute kidney injury during systemic inflammation in mice [J]. J Clin Invest, 2011, 121(10): 4003-4014

(上接第 351 页)

- [13] Salib MM, Hickman PE, Oakman C, et al. Retrospective reassessment of gestational diabetes mellitus diagnosis by using the new classification[J]. *Pathology*, 2015, 47(4): 391-392
- [14] Kwon SS, Kwon JY, Park YW, et al. HbA1c for diagnosis and prognosis of gestational diabetes mellitus[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2015, 110(1): 38-43
- [15] Winters SJ, Gogineni J, Karegar M, et al. Sex hormone-binding globulin gene expression and insulin resistance [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2014, 99(12): E2780-2788
- [16] Mehrabian F, Rezae M. Sex hormone binding globulin measurement before conception as a predictor of gestational diabetes in women with polycystic ovarian syndrome [J]. *J Res Med Sci*, 2013, 18(8): 637-640
- [17] Wang Q, Kangas AJ, Soininen P, et al. Sex hormone-binding risk for type 2 diabetes:observational and causal effect estimates[J]. *Int J Epidemiol*, 2015, 44(2): 623-637
- [18] Mather KJ, Kim C, Christophi CA, et al. Steroid Sex Hormones,Sex Hormone-Binding Globulin,and Diabetes Incidence in the Diabetes Prevention Program [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2015, 100(10): 3778-3786
- [19] Mehrabian F, Rezae M. Sex hormone binding globulin measurement before conception as a predictor of gestational diabetes in women with polycystic ovarian syndrome [J]. *J Res Med Sci*, 2013, 18(8): 637-640
- [20] Caglar GS, Ozdemir ED, Cengiz SD, et al. Sex-hormone-binding globulin early in pregnancy for the prediction of severe gestational diabetes mellitus and related complications[J]. *J Obstet Gynaecol Res*, 2012, 38(11): 1286-1293

- globulin associations with circulating lipids and metabolites and the risk for type 2 diabetes:observational and causal effect estimates[J]. Int J Epidemiol, 2015, 44(2): 623-637
- [18] Mather KJ, Kim C, Christophi CA, et al. Steroid Sex Hormones, Sex Hormone-Binding Globulin, and Diabetes Incidence in the Diabetes Prevention Program [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2015, 100 (10): 3778-3786
- [19] Mehrabian F, Rezae M. Sex hormone binding globulin measurement before conception as a predictor of gestational diabetes in women with polycystic ovarian syndrome [J]. J Res Med Sci, 2013, 18(8): 637-640
- [20] Caglar GS, Ozdemir ED, Cengiz SD, et al. Sex-hormone-binding globulin early in pregnancy for the prediction of severe gestational diabetes mellitus and related complications[J]. J Obstet Gynaecol Res, 2012, 38(11): 1286-1293