

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.01.004

## 常规脂质体介导 shRNA 转染建立 CYP2E1 表达沉默的人肝实质细胞模型\*

周 明<sup>#</sup> 李 浩<sup>#</sup> 王子建 李登科 全正扬 孙震晓<sup>△</sup>

(北京中医药大学生命科学学院 北京 100029)

**摘要 目的:**利用常规脂质体介导转染 shRNA(short hairpin RNA)建立 CYP2E1(cytochrome P450 2E1)表达沉默的人肝实质细胞模型。**方法:**采用文献报道的 CYP2E1 的高效干扰位点,构建 CYP2E1 的 shRNA 干扰载体(shCYP2E1)以及同源无干扰作用的对照载体(shNC,non-specific control),并通过阳离子脂质体 LipoFiter™介导转染人肝实质 L02 细胞,通过绿色荧光蛋白报告基因的表达指示及 G418 筛选阳性克隆,qRT-PCR (quantitative reverse transcription polymerase chain reaction)测定稳定转染细胞系中 CYP2E1 的表达情况。**结果:**确定转染后 G418 最佳筛选浓度为 400  $\mu\text{g/mL}$ ,维持浓度为 200  $\mu\text{g/mL}$ ;获得了荧光表达率较高的 L02-CYP2E1 细胞(CYP2E1 沉默组)和 L02-NC 细胞(转染对照组);qRT-PCR 结果显示,所建细胞系 L02-CYP2E1 相对于 L02-NC,其 CYP2E1 表达下调了近 70 % ( $P<0.05$ ),表明 CYP2E1 干扰表达细胞模型构建成功。**结论:**利用常规脂质体转染法成功转染人肝实质 L02 细胞 CYP2E1shRNA,建立了 CYP2E1 表达沉默的细胞系。

**关键词:**脂质体转染;CYP2E1;shRNA;人肝实质细胞;G418;qRT-PCR

**中图分类号:**R-33;Q78;R322.47;R329.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)01-18-05

## Construction of Conventional Cationic Liposome Interfering Cytochrome P450 2E1-silence Human Hepatic Parenchymal Cell Line\*

ZHOU Ming<sup>#</sup>, LI Hao<sup>#</sup>, WANG Zi-jian, LI Deng-ke, QUAN Zheng-yang, SUN Zhen-xiao<sup>△</sup>

(School of life sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100029, China)

**ABSTRACT Objective:** To build a CYP2E1-silence human hepatic parenchymal cell line by conventional liposome-mediated RNA interference technology. **Methods:** Fluorescence labeling interference vector of CYP2E1 (shCYP2E1) and nonsense vector (shNC, non-specific control) were constructed on the reported efficient interfering sequence. These vectors were transfected into human hepatic parenchymal L02 cells by the cationic liposome LipoFiter™. Positive cell clones were screened by G418 and expression of green fluorescent protein reporting gene. Expression of CYP2E1 of these screened cells were determined by qRT-PCR. **Results:** The optimum selection concentration of G418 was 400  $\mu\text{g/mL}$  and the maintenance concentration was 200  $\mu\text{g/mL}$ . Stable transfected L02-CYP2E1 cells (transfected with vector of CYP2E1) and L02-NC cells(transfected with nonsense vector) were obtained. The qRT-PCR data showed that the CYP2E1 expression in L02-CYP2E1 cells reduced approximately 70 % to L02-NC cells ( $P<0.05$ ), which suggested that L02 cell model with CYP2E1-silence was constructed successfully. **Conclusions:** CYP2E1-silence human hepatic parenchymal cell line was successfully constructed by conventional liposome-mediated RNA interference technology.

**Key words:** Cationic liposome transfection; Cytochrome P450 2E1; Short hairpin RNA; Human hepatic parenchymal cells; G418; qRT-PCR

**Chinese Library Classification(CLC):** R-33; Q78; R322.47; R329.2 **Document code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2018)01-18-05

### 前言

肝脏是药物代谢的重要器官,通过肝脏代谢后许多内源性和外源性的物质对生物体的毒性作用被消除,其中细胞色素 P450 酶(cytochrome P450,CYP450)是参与体内药物 I 相代谢的重要酶系,在外源性化合物(如药物或毒物)的生物转化中起

着十分重要的作用,同时,CYP450 本身在药物的作用下,酶的基因表达及其活性可以被抑制或激活进而影响药物毒性<sup>[1]</sup>,体外研究药物肝毒性与 CYP450 的相关性往往需要获得 CYP450 基因敲除或表达沉默的肝细胞系。RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是利用小干扰 RNA(short or small interfering RNA, siRNA)作用靶基因 mRNA 致其基因表达沉默的一项技术,因

\* 基金项目:国家自然科学基金项目(81473418);国家林业局野生动植物保护项目(2012-2016);

北京中医药大学东直门医院"111"协同创新院际合作项目(No.2016-DZM111-ZY008)

<sup>#</sup> 代表共同第一作者

作者简介:周明,硕士研究生,主要研究方向:微生物与生化药学,E-mail:zhouming@bucm.edu.cn;

李浩,硕士研究生,主要研究方向:微生物与生化药学,E-mail:763617285@qq.com

<sup>△</sup> 通讯作者:孙震晓,教授,博士生导师,主要研究方向:药物药理与毒理,电话:(010) 84738646,E-mail:sunzxcn@hotmail.com

(收稿日期:2017-03-16 接受日期:2017-04-12)

其操作简单高效、干扰特异性强等特点,已被广泛应用于药物靶基因的筛选、肿瘤的靶向治疗等领域<sup>[2,3]</sup>。当实验需要把携带 shRNA(进入细胞内转变为 siRNA)的外源质粒导入肝实质细胞以抑制靶基因表达时,由于正常细胞对外源基因的接纳程度低,往往采用病毒介导转染<sup>[4]</sup>,转染效率高,但因其对实验室安全性的要求等问题在普通实验室往往难以应用。CYP2E1 在肝脏中含量丰富,是乙醇和很多药物的代谢系统,本实验以文献报道慢病毒转染成功的人 CYP2E1 干扰质粒为例<sup>[5]</sup>,探索用常规脂质体转染建立 CYP2E1 表达下调的人肝 L02 细胞系,为在体外利用人肝实质细胞研究药物的细胞毒性与 CYP2E1 基因表达的关系搭建平台。

## 1 实验材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 细胞 人正常肝实质细胞 L02 来源中科院上海细胞所,北京中医药大学生命科学院实验室冻存。

1.1.2 主要试剂 RPMI-1640 培养基、胎牛血清, GIBCO;胰蛋白酶,北京拜尔迪生物技术有限公司;DNA marker(载体线性化)、DNA marker(质粒检测)、DNA 内切酶 *Bbs* I、*Hind* III, MBI;DNA 连接酶、琼脂糖,加拿大 BBI;G418 新霉素,美国 InvivoGen;LipoFiter™ 脂质体转染试剂, 汉恒生物;DNA 凝胶回收试剂盒、PCR 试剂盒 SK2491、无内毒素质粒 DNA 提取试剂盒、引物合成、质量抽提试剂盒,生工生物工程(上海)股份有限公司;无水氯化钙、氯化钠、无乙醇、异丙醇、丙三醇,北京国药集团化学试剂有限公司。

1.1.3 主要仪器及耗材 -80℃冰箱, SANYO 公司;超纯水仪, Milli-Q Biocel 公司;CO<sub>2</sub> 培养箱, SANYO 公司;PCR 仪 Verity 96well, 美国 ABI;超净台, 哈东联;倒置荧光显微镜, Nikon 公司;电热恒温培养箱 DHP-9162, 太仓市华利达实验设备有限公司;电泳仪电泳槽 DYY-8C 型, 北京六一仪器厂;电子天平 ELECTRONI 加拿大 BBI;恒温磁力搅拌器 78-1A, 杭州磐达科技有限公司;恒温振荡培养箱 HZQ-X400, 太仓华美生化仪器有限公司;冷冻离心机 HC-2518R, 加拿大 BBI;凝胶成像仪 FR980, 上海复日科技仪器有限公司;数显恒温水浴锅 HS-800D, 芜湖金瑞特计量检测仪器有限公司;台式高速离心机 TGL-14G, 上海医疗器械有限公司;微型旋涡混合仪 XW-80, 上海沪西分析仪器有限公司。

### 1.2 实验方法与步骤

1.2.1 CYP2E1 高效干扰位点的选择 参阅文献<sup>[6]</sup>, 采用 CYP2E1 基因(gi:45768591)的高效干扰位点 1233-1251, 具体序列为 GCCAGAACACTTCCTGAAT。

1.2.2 CYP2E1 shRNA 干扰载体的构建 载体构建均由上海生工生物工程股份有限公司操作完成。

目的基因靶序列设计:该 shRNA 模板中的 loop 选用了 TTCAAGAGA 结构,同时用以避免形成终止信号,采用 T6 结构作为 shRNA 的转录终止序列。模板正义链 5' 端添加 CACC, 这样可以与 *Bbs* I 酶切后形成的粘端互补;而模板反义链 5' 端添加 AGCT, 与 *Hind* III 酶切后形成的粘端互补;如果 siRNA 的第一个碱基不是 G,则在 CACC 后补加一个 G。

靶位点序列:GAGCCAGAACACTTCCTGAAT

反向互补序列:ATTCAGGAAGTGTCTGGCTC

#### (1) shCYP2E1

shCYP2E1 的转录结构为:



#### (2) shNC

shNC 的转录结构为:



shRNA 表达载体的构建:将上述合成的 DNA 寡核苷酸链分别用 pH 为 8.0 的 TE 缓冲液溶解,使其浓度为 100 μM,进行退火反应,退火反应后,得到浓度为 10 μM 的 shRNA 模板,将所得溶液加 2450 μL 的 ddH<sub>2</sub>O,使其终浓度稀释为 200 nM,用于后续的连接反应。取 10 μg 的 pSGU6/GFP/Neo 载体,37 °C *Bpi* I 和 *Hind* III 双酶切 2 h,进行琼脂糖凝胶电泳,使用 DNA 凝胶回收试剂盒进行回收,电泳检测估算浓度,然后稀释浓度至 50 ng/μL。构建载体 pSGU6/GFP/Neo-shRNA 转化感受态细胞,从各平板上挑取菌落接种到新的含有 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 培养基中扩增培养之后使用碱裂解法抽提质粒,所得质粒用 T7 (T7:5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3') 和 T3 (T3:5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3') 引物做 PCR 检测,反应完成之后将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳分析。

1.2.3 人肝实质细胞 L02 的培养与转染 (1)细胞培养:常规培养 L02 细胞:在含 10%(V/V)胎牛血清(FBS)的 RPMI-1640 培养基,37 °C,5% CO<sub>2</sub> 的饱和湿度培养箱中培养,2-3 d 传代一次,取对数生长期细胞进行实验。(2)阳离子脂质体 LipoFiter™ 介导质粒载体转染 L02 细胞:在转染的前一天,以 50000 个细胞/孔的密度接种 L02 细胞于 24 孔板中,共铺 6 个孔,24 h 至细胞密度达到 40-70%左右时,细胞孔板更换为无血清无双抗的 RPMI-1640 培养基。同时用无血清无双抗的 RPMI-1640 培养基稀释 shCYP2E1 载体质粒及阳离子脂质体 LipoFiter™,按比例混匀 shCYP2E1 载体质粒和阳离子脂质体 LipoFiter™,室温孵育 30 min 形成 shCYP2E1/LipoFiter™ 复合物,细胞孔板内加入复合物混合液培养 6 h 后更换为含 10%血清的 RPMI-1640 培养基,经转染 24-48 h,使用荧光倒置显微镜观察绿色荧光蛋白的表达情况,作为转染成功的标志,具体步骤参照汉恒生物 LipoFiter™ 脂质体转染试剂盒说明书。设立阴性对照组载体 shNC,验证沉默 CYP2E1 基因的 shRNA 载体的可行性。

1.2.4 G418 筛选稳定转染 CYP2E1 shRNA 载体的 L02 细胞 (1)G418 用药浓度预实验:参考文献<sup>[7,8]</sup>MTT 实验,考察不同浓度 G418 作用 L02 细胞 72 h 的毒性大小,选出预实验的大致用药浓度范围。(2)G418 筛选稳定转染的细胞:转染 24 h 之后加 G418 进行筛选,每 3 d 更换一次含有 G418 的培养基,一周后可见细胞大量死亡,两周时可见单细胞克隆,此时的药物浓度降至筛选浓度的一半,使细胞快速生长。

1.2.5 qRT-PCR 测定 L02 模型细胞中 CYP2E1 mRNA 表达的抑制情况 将 shCYP2E1 沉默组细胞 (L02-shCYP2E1) 和 shNC 空白载体转染的阴性组细胞 (L02-shNC) 及正常的 L02

细胞分别计数,以 180,000 个细胞 / 孔的数量接种于 6 孔板中,每孔 3 mL,待细胞贴壁汇合度达到 90 %左右时,按 RNA-pure 快速提取试剂盒方法提取各组 RNA,测定浓度以及验证 RNA 完整性没有问题后,分别取 0.5  $\mu$ g 的 RNA 逆转录合成 cDNA 第一条链,实时荧光定量检测各组的 CYP2E1 mRNA 相对表达量。CYP2E1 上游引物:5'-GCAAGAGATGCCCTA-CATGGA-3',下游引物:5'-GGGCACGAGGGTGTATGAA-3'; $\beta$ -actin 上游引物:5'-TAGGCGCAAGTACTCTGTGTGGAT-3',下游引物:5'-TAGAAGCATTTGCGGTGCACGATG-3'。

### 1.3 统计学处理

采用 SPASS19.0 软件进行统计学分析。所有实验重复 3 次,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  描述,2 组比较采用完全随机 t 检验(方差齐时)或 t' 检验(方差不齐时),3 组均数比较采用方差分析,两两比较采用 LSD 法。检验水准  $P=0.05$ 。

## 2 实验结果

### 2.1 shCYP2E1 干扰载体构建

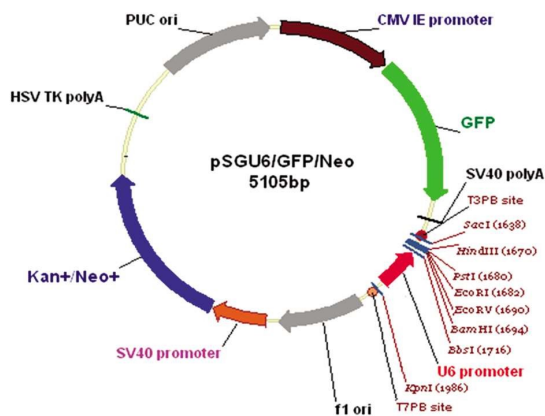


图 1 pSGU6/GFP/Neo 载体示意图

Fig.1 Schematic diagram of pSGU6/GFP/Neo vector

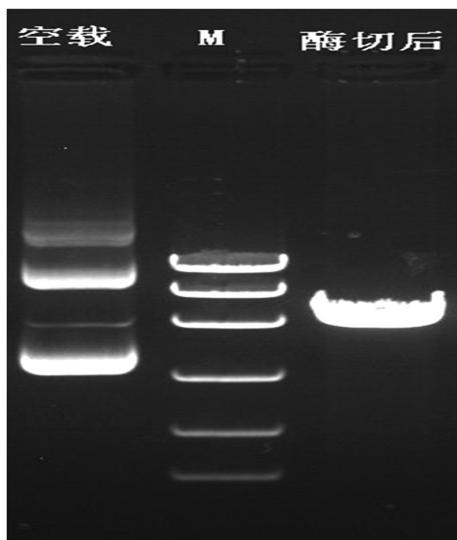


图 2 pSGU6/GFP/Neo 载体线性化后的凝胶回收条带

(中间为 M 代表 marker,共 6 条带,从上到下依次为 10000、7000、5000、3000、2000、1500 bp)

Fig.2 Gel recovery bands with pSGU6 / GFP / Neo vector linearization (The middle of M stands for marker, a total of 6 bands, from top to bottom followed by 10000, 7000, 5000, 3000, 2000, 1500 bp)

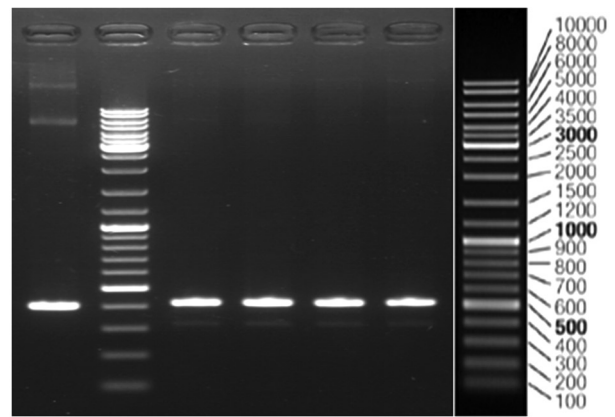


图 3 阳性载体琼脂糖电泳图

Fig.3 Positive carrier agarose electrophoresis

图 1 为所使用的载体的模式图,由图 1 可知,pS-GU6/GFP/Neo 载体含有 GFP 绿色荧光蛋白表达标签、Neo (新霉素 G418)抗性以及 *Bbs* I、*Hind* III 等多种酶切位点以便目的基因的链接,由图 2 可知,该载体线性化处理非常好,与 shD-NA template 连接后,在感受态细胞中转化,从而得到阳性克隆,抽提其质粒后进行 PCR 反应,其产物琼脂糖凝胶电泳见图 3,marker 左侧为空载体的 PCR 条带 413 bp,右侧为阳性构建成功的载体 PCR 条带 429 bp,综上所述,shCYP2E1 干扰载体构建成功。

### 2.2 转染效率计算

含有 shCYP2E1 或者 shNC 载体与 Lipfectamine2000 复合物转染 L02 细胞 6 h 后,换成含血清的 1640 培养基,继续培养 18 h,即 24 h 后在倒置荧光显微镜下观察细胞的绿色荧光表达情况,计算带绿色荧光的细胞数和细胞总数,按转染效率 = 绿色荧光细胞数 / 细胞总数,L02-shNC 组细胞和 L02-shCYP2E1 组细胞的荧光率均在 20 %左右。

### 2.3 G418 筛选浓度的确定及筛选结果

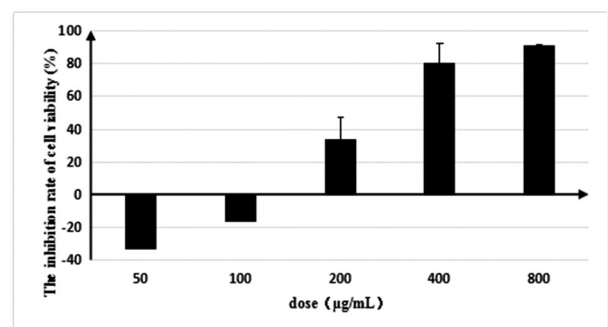


图 4 G418 作用于 L02 细胞 72 h 后的增殖抑制率情况

Fig. 4 The effect of G418 on the proliferation inhibition rate of L02 cells after treated with 72 hours

由图 4 可知,G418 对 L02 细胞的抑制作用有剂量依赖性,作用 72 h 后,400  $\mu$ g/mL 的浓度达到了 80 %的抑制率,200  $\mu$ g/mL 只有不到 40 %的抑制率,好的筛选方法应该是筛选 3 d 左右时,细胞会大量死亡,之后继续维持加药浓度直到阳性克隆出现,进一步进行实验,由表 1 确定 G418 的筛选浓度是 400  $\mu$ g/mL,维持浓度为 200  $\mu$ g/mL。构建形成 shCYP2E1/LipoF-iter<sup>TM</sup> 复合物 6 h 后,换含血清的 RPMI-1640 培养基继续培养

18 h 后, 加 400  $\mu\text{g/mL}$  的 G418, 三天后换新的含 400  $\mu\text{g/mL}$  G418 的含血清 RPMI-1640 培养基, 细胞大量死亡, 调整 G418 浓度维持 200  $\mu\text{g/mL}$  继续筛选 12 d, 倒置荧光显微镜

下观察, 得到转染阳性细胞群, 如图 5, 继续扩增至实验需要细胞量。

表 1 不同浓度 G418 作用于 L02 细胞 12 d 后的生长情况

Table 1 The growth situation of L02 cells treated with different concentrations of G418 for 12 days

| Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ ) / days | 3    | 4    | 8    | 12   |
|-------------------------------------------|------|------|------|------|
| 100                                       | good | good | good | good |
| 200                                       | good | good | poor | poor |
| 400                                       | poor | poor | dead | -    |
| 500                                       | poor | poor | dead | -    |
| 600                                       | poor | poor | dead | -    |
| 700                                       | poor | poor | dead | -    |
| 800                                       | poor | dead | -    | -    |
| 900                                       | dead | -    | -    | -    |
| 1000                                      | dead | -    | -    | -    |

Note: ("Good" stands for there is basically no death, "poor" stands for more than 50% cells are died)

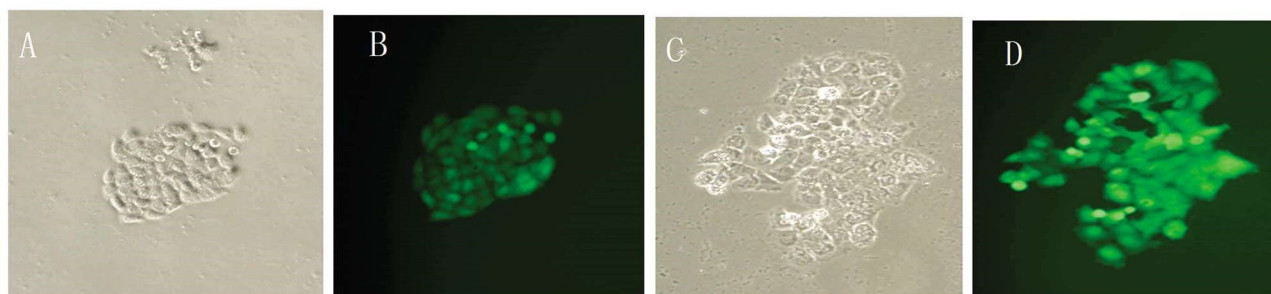


图 5 筛选得到的阳性细胞群(A、B 为 L02-shCYP2E1, C、D 为 L02-shNC)

Fig.5 Screening of positive cells (A, B are L02-shCYP2E1, C, D are L02-shNC)

## 2.4 转染 shRNA 载体干扰效果

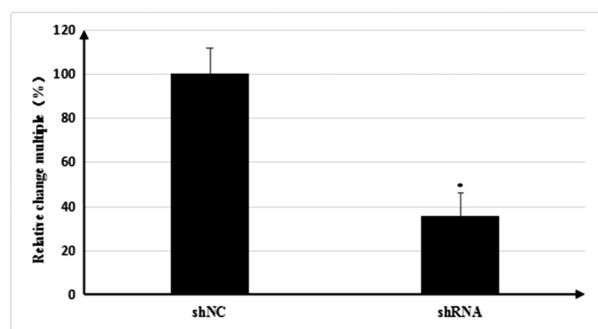


图 6 L02-shCYP2E1 与 L02-shNC 中 CYP2E1 mRNA 相对表达量

Fig.6 Relative expression of CYP2E1 mRNA in L02-shCYP2E1 and L02-shNC

qRT-PCR 结果见图 6, shRNA 转染组 L02-shCYP2E1 mRNA 表达水平比 shNC 组 L02-shNC 下调了约 70 % ( $p < 0.05$ ), 表明 CYP2E1 沉默 L02 细胞模型构建成功。

## 3 讨论

CYP2E1 的基因位于第 10 号染色体上, 是一种主要存在于内质网上的蛋白质, 该酶主要分布在成人肝脏, 特别是富集在肝小叶中心区域, 其蛋白表达量占肝 CYP 总量的 7 %, 但是 mRNA 表达量超过了 CYP 总量的一半<sup>[9]</sup>。CYP2E1 对乙醇、亚

硝酸、苯类以及四氯化碳等毒性物质具有特异的代谢作用, 参与代谢活化与失活多种药物、前毒物和前致癌物<sup>[10-14]</sup>。

生物细胞功能性抑制的方法主要有小分子拮抗剂、能与蛋白质和其它小分子物质结合的单链寡核苷酸、有催化活性的 RNA、基因敲除等, 然而这些方法或因缺乏特异性或因技术难度高而难以广泛应用, 随着 RNAi 技术的兴起, 越来越多的实验室采用 RNAi 技术抑制基因表达用于基因功能等的研究<sup>[15]</sup>。徐新云等<sup>[16]</sup> 通过设计合成的短发卡 RNA (shRNA), 连接到 pLKO.1-puro 质粒中构建了 CYP1A2 的 shRNA 慢病毒表达载体转染 L02 细胞, 实验证明 CYP1A2 表达的沉默可以降低三氯乙烯对 L02 细胞凋亡基因和癌基因的活化作用, 陈杰等<sup>[17]</sup> 人应用 RNA 干扰技术成功地抑制了 CYP3A4 基因的表达, 在 mRNA 水平和蛋白表达水平的抑制率分别为 70 % 和 75 %。目前国内实验室研究较多的为 CYP2E1 的沉默, 徐芸<sup>[18]</sup> 通过实验从四个备选干扰位点中确定了人源 CYP2E1 转录本 (mRNA) 的 1233-1251 位点为最佳干扰位点, 毛吉炎等<sup>[19]</sup> 人通过实验, 证实该位点为最佳高效干扰位点。本研究参考文献报道的 CYP2E1 的高效干扰位点, 构建带有荧光标记的 CYP2E1 的 shRNA 干扰载体 (shCYP2E1), 并通过阳离子脂质体 LipoFiter™ 介导转染人肝实质 L02 细胞, 成功建立了 CYP2E1 沉默的人正常肝实质 L02 细胞模型。文献报道用该干扰位点构建慢病毒载体, 利用病毒转染细胞, 其转染率及载体基因整合到细

胞染色体上的概率都要比普通载体高,对 CYP2E1 的 mRNA 表达的抑制率可以高达 86.9 %<sup>[19]</sup>,本实验的干扰效率虽然低于文献报道,但对于安全级别不高的普通实验室是一种可行的选择。

实验中,为了克服正常细胞转染效率较低,阳性克隆不易筛选和扩增的弱点,我们设计 shRNA 载体时增加了绿色荧光蛋白标记,同时为了提高稳定转染的细胞所占的比例也探索了一些方法,一般筛选稳定转染细胞比较可行的方法为有限稀释法,将转染后的细胞消化下来,通过细胞计数,持续稀释至单克隆细胞,该方法实验周期太长,实际操作中发现,转染后的细胞数量太少的话难以成活,而且荧光细胞较少,所需的操作很复杂,在本实验中,我们参考别人的经验,进行了一种可以快速提高荧光细胞率的方法,用灭菌的滤纸片蘸取细胞消化液局部消化挑选稳定转染的细胞,使用该方法后,可以将 NC 组细胞的荧光率提高到 80 %。

综上所述,本实验成功建立 CYP2E1 表达沉默的人肝实质细胞系,该细胞模型的建立为在体外利用细胞模型研究药物的细胞毒性与 CYP450 基因表达的相关性搭建了平台<sup>[20,21]</sup>。

#### 参考文献(References)

- [1] Pelkonen O, Turpeinen M, Hakkola J, et al. Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status[J]. Archives of Toxicology, 2008, 82(10): 667-715
- [2] Doqini D B, Pascoal V D A B, Avansini S H, et al. The new world of RNAs[J]. Genetics and molecular biology, 2014, 37(1): 285-293
- [3] 万志红, 王宇明. 基因功能研究新途径 -RNA 干扰 [J]. 世界华人消化杂志, 2004, 12(4): 962-964  
Wan Zhi-hong, Wang Yu-ming. A new approach of studying gene function- RNA interference [J]. World Chinese Journal of Digestology, 2004, 12(4): 962-964
- [4] Emery M G, Jubert C, Thummel K E, et al. Duration of cytochrome P-450 2E1(CYP2E1) inhibition and estimation of functional CYP2E1 enzyme half-life after single-dose disulfiram administration in humans [J]. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1999, 291(1): 213-219
- [5] 徐芸, 万志红, 李继昌. 构建高效抑制细胞色素 P4502E1 基因转录位点的 siRNA 表达载体[J]. 肝脏, 2007, 12(4): 271-274  
Xu Yun, Wan Zhi-hong, Li Ji-chang. Construction of siRNA expression vector to the optimal point depression transcription for cytochrome P450 2E1 gene[J]. Chinese Hepatology, 2007, 12(4): 271-274
- [6] Wu R M, Cheng C W, Chen K H, et al. Genetic polymorphism of the CYP2E1 gene and susceptibility to Parkinson's disease in Taiwanese [J]. Journal of neural Transmission, 2002, 109(11): 1403-1414
- [7] 李子木, 孙震晓. 伊立替康联合去甲斑蝥素对人胃癌细胞作用的考察及协同作用机制研究 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2015, 42(2): 169-180  
Li Zi-mu, Sun Zhen-xiao. The Effect and the synergistic mechanism of irinotecan combined with norcantharidin in human gastric cancer cell line BGC-823[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2015, 42(2): 169-180
- [8] Li Zi-mu, Wang Min, Xu Zhi-lan, et al. Differential cytotoxic effects of hydroxycamptothecin on human lung cancer cells versus human embryo lung fibroblast cells [J]. Chinese J Pharmacol Toxicol, 2014, 28(3): 315-320
- [9] 伍忠奎, 谢红光, 周宏源. 细胞色素 P450 2E1 的研究进展 [J]. 中国临床药理学杂志, 1997, 13(1): 57-62  
Wu Zhong-luan, Xie Hong-guang, Zhou Hong-hao. Recent advance of cytochrome P450 2E1[J]. The Chinese Journal of Clinical Pharmacology, 1997, 13(1): 57-62
- [10] Tang K, Li Y, Zhang Z, et al. The PstI/RsaI and DraI polymorphisms of CYP2E1 and head and neck cancer risk: a meta-analysis based on 21 case-control studies[J]. BMC Cancer, 2010, 10(575): 1471-2407
- [11] 张文宇, 马满玲. 细胞色素 P4502E1 与乙醇代谢相关的肝损伤研究进展[J]. 西部医学, 2016, 28(11): 1625-1628  
Zhang Wen-yu, Ma Man-ling. Progress of cytochrome P4502E1 and alcohol metabolism genes associated with liver damage [J]. Medical Journal of West China, 2016, 28(11): 1625-1628
- [12] 钱明雪, 李胜立, 李凡. 6 种石斛多糖抗亚急性酒精性肝损伤作用的比较[J]. 中国药理学杂志, 2015, 50(24): 2117-2123  
Qian Ming-xue, Li Sheng-li, Li Fan. Effects of polysaccharides from six different dendrobium species against alcohol-induced subacute liver injury in mice[J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2015, 50(24): 2117-2123
- [13] 梁冰, 曹家艳, 张爱华. CYP1A1 和 CYP2E1 基因多态性与燃煤型砷中毒发病风险关系[J]. 中国公共卫生, 2015, 31(10): 1313-1316  
Liang Bing, Cao Jia-yan, Zhang Ai-hua. Association of CYP1A1 and CYP2E1 gene polymorphism with risk of arsenism caused by coal-burning [J]. Chinese Journal of Public Health, 2015, 31(10): 1313-1316
- [14] 苏泽虎, 骆子义, 郭宇美. CYP2E1 基因多态性与抗结核药物性肝炎的相关性[J]. 医药导报, 2013, 32(8): 32-34  
Su Ze-hu, Luo Zi-yi, Wu Yu-mei. The relationship between polymorphism of CYP2E1 gene And genetic susceptibility to anti-TB drug-induced hepatitis[J]. Herald of Medicine, 2013, 32(8): 32-34
- [15] 赵雪萌, 余祖江. 基因沉默的工具 -RNA 干扰技术的研究进展[J]. 河南医学研究, 2015, 24(1): 74-75  
Zhao Xue-meng, Xu Zu-jiang. Tool of gene silence-recent progress of RNA interference[J]. HeNan Medical Research, 2015, 24(1): 74-75
- [16] 徐新云, 毛侃琅, 毛吉炎, 等. CYP1A2 基因沉默及其对三氯乙烯毒性影响[J]. 中国职业医学, 2013, 40(4): 287-296  
Xu Xin-yun, Mao Kan-lang, Mao Ji-Yan, et al. Construction of CYP1A2-silence hepatocytes and the effects of CYP1A2-silence on trichloroethylene toxicity[J]. China Occupational Medicine, 2013, 40(4): 287-296
- [17] 陈杰, 赵立子, 邓颖, 等. RNA 干扰抑制 CYP3A4 基因表达的实验研究[J]. 中国基层医药, 2006, 13(4): 543-545  
Chen Jie, Zhao Li-zi, Deng Ying, et al. Small interfering RNA mediated silencing of cytochrome P450 3A4 gene [J]. Chinese Journal of Primary Medicine and Pharmacy, 2006, 13(4): 543-545
- [18] 徐芸. RNA 干扰抑制细胞色素 P450 2E1 基因表达及降低诱导剂肝细胞毒性的研究[D]. 郑州大学, 2005  
Xu Yun. RNAi control expression of cytochrome P450 2E1 and reduction of the toxicity of inducers to hepatic cell[D]. Zhengzhou University, 2005
- [19] 毛吉炎, 徐新云, 何晓阳, 等. CYP2E1 基因 RNA 干扰载体的构建与表达[J]. 癌变·畸变·突变, 2012, 24(4): 290-294

- ing Loss in Young Adults With Diabetes Mellitus Type 2 Using High Frequency Audiometry [J]. Indian Journal of Otolaryngology and Head & Neck Surgery, 2015, 67(3): 234-237
- [14] 张博,韩睿.线粒体基因与糖尿病的研究进展[J].中华临床医师杂志, 2012, 6(22): 7341-7343  
Zhang Bo, Han Rui. Research progress of mitochondrial gene and diabetes mellitus [J]. Chinese Journal of Clinicians, 2012, 6 (22): 7341-7343
- [15] Jin Z, Guo J, Fang W, et al. Clinical features of MELAS and its relation with A3243G gene point mutation [J]. International Journal of Clinical & Experimental Pathology, 2015, 8(10): 13411
- [16] 杨蓬,张曼娜,盛春君,等.线粒体 tRNA<sup>Leu</sup>(UUR)基因 A3243G 突变糖尿病患者的临床特征[J].中华糖尿病杂志, 2015, 23(2): 97-101  
Yang Peng, Zhang Man-na, Sheng Chun-jun, et al. Clinical characteristics of diabetes with mitochondrial tRNA<sup>Leu</sup>(UUR)gene 3243 A to G mutation[J]. Chinese Journal of Diabetes, 2015, 23(2): 97-101
- [17] 王鉴,顾鸣敏.线粒体基因突变与糖尿病的相关性研究进展[J].现代生物医学进展, 2012, 12(24): 4752-4756  
Wang Jian, Gu Ming-min. Study on Mitochondrial Gene Mutation Associated with Diabetes Mellitus [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2012, 12(24): 4752-4756
- [18] 周美岑, 闵锐, 纪建军, 等. 母系遗传伴耳聋糖尿病患者线粒体 DNA3243A>G 突变与临床特点之间的关系[J].中华内分泌代谢杂志, 2016, 32(1): 33-37  
Zhou Mei-cen, Min Rui, Ji Jian-jun, et al. Association of clinical features with mitochondrial DNA 3243 A to G mutation heteroplasmy levels in patients with maternally inherited diabetes and deafness[J]. Chinese Journal of Endocrinology and Metabolism, 2016, 32 (1): 33-37
- [19] 张小勤,陈琳,杨宇,等.线粒体 DNA3243A→G 异质水平定量检测方法的建立及应用[J]. 中华医学遗传学杂志, 2014, 31(4): 438-443  
Zhang Xiao-qin, Chen Lin, Yang Yu, et al. Establishment and application of quantitative detection for heteroplasmic mtDNA mutation 3243A→G [J]. Chinese Journal of Medical Genetics, 2014, 31 (4): 438-443
- [20] 王晓兵.二甲双胍相关性乳酸酸中毒的研究进展 [J]. 安徽医学, 2014, 35(1): 130-133  
Wang Xiao-bing. Research progress of metformin-induced lactic acidosis [J]. Anhui Medical and Pharmaceutical Journal, 2014, 35 (1): 130-133
- [21] 刘晓燕,陈凤玲.线粒体基因突变糖尿病的基因诊断与治疗进展[J].医学临床研究, 2009, 26(2): 336-339  
Liu Xiao-yan, Chen Feng-ling. Advances in gene diagnosis and treatment of mitochondrial diabetes mellitus [J]. Journal of Clinical Research, 2009, 26(2): 336-339
- [22] Tsai H Y, Lin C P, Huang P H, et al. Coenzyme Q10 Attenuates High Glucose-Induced Endothelial Progenitor Cell Dysfunction through AMP-Activated Protein Kinase Pathways [J]. Journal of Diabetes Research, 2016, 2016(4): 1-14
- [23] Noor Kadhim Mohammed-Jawad, May Al-Sabbagh, Kaiss A. AL-Jezaeri. Role of L-carnitine and Coenzyme Q10 as Adjuvant Therapy in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus[J]. American Journal of Pharmacological Sciences, 2014, 2(5): 82-86
- [24] Shen Q, Pierce J D. Supplementation of Coenzyme Q10 among Patients with Type 2 Diabetes Mellitus [J]. Healthcare, 2015, 3 (2): 296-309
- [25] Liu J. The effects and mechanisms of mitochondrial nutrient alpha-lipoic acid on improving age-associated mitochondrial and cognitive dysfunction: an overview [J]. Neurochemical Research, 2008, 33(1): 194-203
- [26] Mahata B, Mukherjee S, Mishra S, et al. Functional delivery of a cytosolic tRNA into mutant mitochondria of human cells [J]. Science, 2006, 314: 471-474

(上接第 22 页)

- Mao Ji-yan, Xu Xin-yun, He Xiao-yang, et al. Construction and identification of lentivirus vectors interfering CYP2E1 gene expression in L02 cells[J]. Carcinogenesis; Teratogenesis & Mutagenesis, 2012, 24 (4): 290-294
- [20] 刘晨辉,乐江.细胞色素 P450 CYP2E1 酶构型特征及其表达调控机制的研究进展 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2010, 24(2): 155-160  
Liu Chen-hui, Yue Jiang. Progress of research on characteristics of cytochrome P-450 CYP2E1 in protein structure and regulation mechanisms [J]. Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology, 2010, 24(2): 155-160
- [21] 裴彦宇,高虹.细胞色素 P450 2E1 的毒性机制研究进展 [J]. 中国医药导报, 2015, 12(19): 39-44  
Pei Yan-yu, Gao Hong. Research progress on toxicity mechanism of cytochrome P450 2E1[J]. China Medical Herald, 12(19): 39-44