

慢病毒介导 shRNA 抑制 *Sirt1* 基因表达对猪前体脂肪细胞凋亡的影响

杨 扬, 张 朝, 庞卫军, 杨公社

(西北农林科技大学 动物科技学院 动物脂肪沉积与肌肉发育实验室, 陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 **【目的】**探讨慢病毒介导的 shRNA 干扰系统抑制脱乙酰基酶 1(Sirtuin type 1, *Sirt1*) 表达对猪前体脂肪细胞凋亡的影响。**【方法】**构建 pLentiH1-*Sirt1* shRNA 慢病毒载体, 将其感染猪前体脂肪细胞, 运用 Hoechst 33258 染色, 于荧光显微镜下观察细胞的形态学变化; 流式细胞术检测细胞凋亡率; Western 印迹检测细胞凋亡标志物 Cleaved caspase-3 的表达情况。**【结果】**pLentiH1-*Sirt1* shRNA 慢病毒载体可抑制猪前体脂肪细胞中 *Sirt1* 的表达, 显微镜下可见细胞体积缩小、染色质凝集、核固缩等典型的凋亡特征; 流式细胞术显示细胞凋亡率较空载体对照组明显增加, 早期和晚期凋亡细胞百分率分别从 4% 和 9% ($P < 0.05$) 上升至 30% 和 32% ($P < 0.05$); Western 印迹检测显示 Cleaved caspase-3 蛋白表达水平显著上调。**【结论】**慢病毒介导的 shRNA 可有效地抑制猪前体脂肪细胞中 *Sirt1* 的表达, 显著促进细胞凋亡, 提示 *Sirt1* 可能在前体脂肪细胞凋亡中发挥着重要作用。

【关键词】 *Sirt1*; shRNA; 慢病毒; 猪前体脂肪细胞; 细胞凋亡

【中图分类号】 Q786

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2010)12-0031-07

Effects of *Sirt1* inhibition by lentivirus-mediated shRNA vector on apoptosis of porcine preadipocytes

YANG Yang, ZHANG Zhao, PANG Wei-Jun, YANG Gong-She

(Laboratory of Animal Fat Deposition and Muscle Development, College of Animal Science and Technology,
Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】** The study was to investigate the effects of *Sirt1* inhibition by lentivirus-mediated shRNA vector on apoptosis of porcine preadipocytes. **【Method】** pLentiH1-*Sirt1* shRNA lentivirus vector was constructed to infect porcine preadipocytes. The morphological changes of cells were observed under fluorescence microscope after Hoechst 33258 staining; flow cytometer was used to assess the percentages of apoptotic cells; expression of apoptotic marker Cleaved caspase-3 in porcine preadipocytes was examined by Western blotting analysis. **【Result】** After *Sirt1* expression was inhibited by lentiviral *Sirt1* shRNA infection. Preadipocytes showed characteristic morphological features of apoptosis under fluorescence microscope, such as reduced cell volume, chromatin condensation and nuclear shrinkage. Apoptosis rate in cells infected with *Sirt1* shRNA was significantly increased compared with that of empty vector group, and the early apoptotic and late apoptotic cell fractions increased from 4% and 9% ($P < 0.05$) to 30% and 32% ($P < 0.05$), respectively, assessed with flow cytometric analysis. Western blotting analysis showed that inhibition of *Sirt1* also upregulated the Cleaved caspase-3 expression. **【Conclusion】** Lentivirus-mediated shRNA vector effectively inhibited *Sirt1* expression and remarkably induced apoptosis in porcine preadipo-

* [收稿日期] 2010-05-06

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30600437); 西北农林科技大学青年学术骨干支持计划(0114030)

[作者简介] 杨 扬(1986—), 女, 山东曲阜人, 在读硕士, 主要从事动物学研究。E-mail: yangyang-19860723@163.com

[通信作者] 庞卫军(1972—), 男, 陕西汉中, 副教授, 硕士生导师, 主要从事动物遗传育种研究。E-mail: pwj1226@hotmail.com

cytes. These results suggest that Sirt1 may play an important role in the apoptosis of preadipocytes.

Key words: Sirt1; shRNA; lentivirus; porcine preadipocyte; apoptosis

脂肪组织是重要的能量储存器官,对机体能量稳态的维持起着关键的调节作用^[1]。脂肪细胞是脂肪组织的基本组成单位^[2],脂肪细胞的数量除受前体脂肪细胞增殖、分化的调控外,还受前体脂肪细胞凋亡的影响,因此前体脂肪细胞的凋亡调控可作为降低体脂沉积的关键途径。Miller 等^[3]研究发现,体质量下降是由脂肪细胞体积缩小和数量减少引起的,但并未探讨细胞数量减少的作用机制。Prins 等^[4]首次证明,人类的脂肪细胞在体外培养时,可由于缺乏生长因子或轻微热损伤而导致凋亡。随后许多学者对脂肪细胞凋亡过程及其调节机制进行了更为深入的研究,但这些研究主要集中在 3T3-L1 脂肪细胞系和人、鼠原代培养的脂肪细胞上^[5-7],尚未见关于猪前体脂肪细胞凋亡的报道。

Sirt1 是 NAD⁺ 依赖性组蛋白脱乙酰基酶家族成员之一,其参与细胞增殖分化、能量代谢、转录沉默等多方面调控^[8]。在 3T3-L1 细胞中,Sirt1 可抑制前体脂肪细胞分化并促进脂肪动员,是脂肪形成的负调控因子^[9]。但至今未见关于 Sirt1 调控前体脂肪细胞凋亡的报道。为深入探究 Sirt1 对前体脂肪细胞凋亡的影响及其分子机制,本试验构建了 Sirt1 shRNA 慢病毒载体,将其感染体外培养的原代猪前体脂肪细胞,采用 Western 印迹检测 Sirt1 及 Cleaved caspase-3 的表达,并用 Hoechst 染色及流式细胞术,检测 Sirt1 下调对猪前体脂肪细胞凋亡的影响,以期通过促前体脂肪细胞凋亡而减少体脂沉积提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

慢病毒载体 pLentiH1 及包装系统(包装质粒 $\Delta 8.9$ 和包膜蛋白质粒 VSV-G),由西北农林科技大学动物科技学院动物脂肪沉积与肌肉发育实验室保存;293T 细胞,购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心;胎牛血清,购自杭州四季青公司;DMEM/F12 培养基,购自 Gibco 公司;大肠杆菌 DH5 α ,购自天根生化科技有限公司;LipofectionTM 2000,购自 Invitrogen 公司;BamH I、Xho I 限制性内切酶及 T4 DNA 连接酶,购自 TaKaRa 公司;质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒,购自 BioFlux 公司;polybrene,购自 Sigma 公司;Hoechst 33258 染色试

剂盒和 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒,购自南京凯基生物科技发展有限公司;Sirt1、Cleaved caspase-3 和 β -actin 鼠源多克隆抗体,购自 Santa Cruz 公司。

1.2 方法

1.2.1 猪原代前体脂肪细胞的培养 取健康仔猪背部皮下脂肪组织,无菌状态下剪成 1 mm² 的组织块,加入 I 型胶原酶,37 °C 消化 1 h;加含血清培养液终止消化,过孔径 0.074 mm 不锈钢细胞筛,收集滤液,2 000 r/min 离心 10 min;弃上清液,加入无血清培养液清洗细胞,1 000 r/min 离心 5 min;收集细胞沉淀,加含血清培养液吹打成均匀的细胞悬液,并以 2.5×10^5 /皿的接种量接种于直径 60 mm 培养皿中,置 37 °C、体积分数 5% CO₂ 培养箱内培养。

1.2.2 pLentiH1-Sirt1 shRNA 慢病毒载体的构建及对猪前体脂肪细胞的感染 根据 GenBank 中猪 Sirt1 基因序列(EU030283.2)及 shRNA 设计原则,设计并合成(上海生工生物有限公司合成)3 针对目的基因 CDs 区的 Oligo DNA 序列,并筛选出有效序列,其正义链为 5'-GATCCGGATGAAAGT-GAGATTGAATCAAGAGTTCAATCTCACTTT CATCCTTTTTTTC-3',反义链为 5'-TCGAGAAAA AAGGATGAAAGTGAGATTGAACTCTTGATT CAATCTCACTTTTCATCCG-3'。

将 shRNA 有效序列与慢病毒载体 pLentiH1 连接,吸取连接产物转化 DH5 α 感受态细胞,筛选重组阳性克隆进行 BamH I、Xho I 双酶切及 DNA 测序鉴定。将经鉴定正确的 pLentiH1-Sirt1 shRNA 慢病毒载体与包装系统质粒共转染 293T 细胞,转染 48 h 后收集病毒液,经除菌、浓缩制备高滴度的病毒液,将病毒感染猪前体脂肪细胞,同时设立空载体对照和空白对照组,48 h 后收集细胞进行后续试验。

1.2.3 猪前体脂肪细胞 Sirt1 和 Cleaved caspase-3 蛋白表达的检测 收集各组细胞并提取总蛋白,Bradford 法测定蛋白浓度后进行 SDS-PAGE 电泳,每处理设 3 个重复。将电泳后的蛋白转移至 PVDF 膜上,脱脂奶粉封闭 2 h,加入合适浓度的 Sirt1 或 Cleaved caspase-3 一抗,于 4 °C 孵育过夜。次日用 TBST 洗膜 3 次,加入 HRP 标记的二抗,室温孵育 1.5 h, TBST 洗膜 3 次,用化学发光液浸润 PVDF

膜蛋白面,并以 ChemiDoc XRS 曝光系统检测蛋白条带亮度。以 β -actin 蛋白作为内参,用 Quantity One (Bio-Rad, USA) 软件分析蛋白条带密度值和表达量。各组 *Sirt1* 蛋白或 Cleaved caspase-3 蛋白光密度值除以 β -actin 蛋白的光密度值,即为 *Sirt1* 或 Cleaved caspase-3 蛋白的相对表达量。

1.2.4 Hoechst 染色 收集各组细胞,吸去培养液, PBS 洗涤 2 次,用体积分数 4% 的甲醛溶液于 4℃ 固定细胞 10 min,滴加适量 Hoechst 33258 染色液,室温染色 10 min,荧光显微镜下观察细胞凋亡情况。凋亡细胞由于染色体高度浓缩,对 Hoechst 33258 的摄取增强,染色呈强蓝色荧光,而正常细胞只呈微弱荧光,死细胞不被染色。

1.2.5 流式细胞术分析 收集各组细胞,用不含 EDTA 的胰酶消化后制成细胞悬液,用 PBS 洗涤 2 次(2 000 r/min 离心 5 min),收集 5×10^5 个细胞,加入 500 μ L 的 Binding Buffer 悬浮细胞,再依次加入 5 μ L Annexin V-FITC 和 5 μ L Propidium Iodide,轻轻混匀,室温避光反应 15 min,用流式细胞仪检测(激发波长 $E_x=488$ nm),并以 Cell Quest 分析软件计算各时期的细胞凋亡百分率。

1.2.6 数据统计与分析 采用 SPSS 16. 0 软件和 t 检验对数据进行统计学分析。

2 结果与分析

2.1 pLentiH1-Sirt1 shRNA 慢病毒载体的鉴定

挑取重组阳性克隆,提取质粒,用 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切重组质粒 pLentiH1-Sirt1 shRNA,得到长度为 57 bp 的片段(图 1)。测序结果证实,重组慢病毒载体的插入序列与设计序列一致,没有碱基缺失或替换等(图 2),表明慢病毒载体 pLentiH1-Sirt1 shRNA 构建成功。

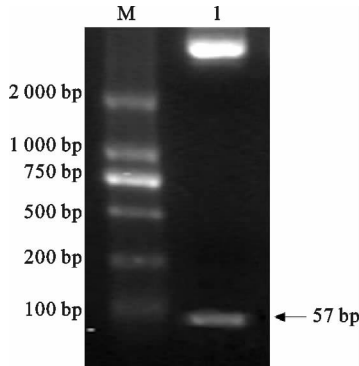


图 1 重组慢病毒载体阳性克隆的酶切鉴定

M. 2000 bp DNA Marker; 1. 双酶切产物

Fig. 1 Identification of positive lentiviral vector by restriction enzyme digestion

M. 2000 bp DNA Marker; 1. Digested product

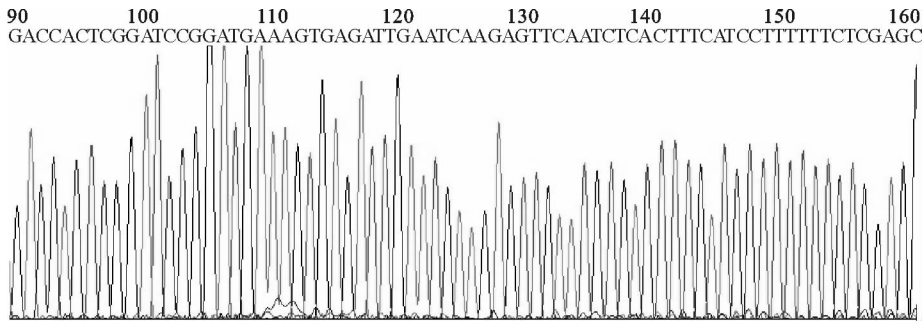


图 2 重组慢病毒载体阳性克隆的 DNA 测序鉴定

Fig. 2 Identification of positive lentiviral vector by DNA sequencing

2.2 pLentiH1-Sirt1 shRNA 慢病毒载体的包装及对猪前体脂肪细胞的感染

用重组慢病毒载体 pLentiH1-Sirt1 shRNA(或空载体)和包装系统质粒共转染 293T 细胞,转染 24 h 后,细胞生长良好,绿色荧光强度高(图 3),表明病毒包装成功。转染 48 h 后收集病毒液,进行病毒滴度测定,经计算病毒滴度为 5×10^7 PFU/mL,满足后续试验的要求。将病毒液稀释成所需浓度后感染融合率达 70%~80% 的猪前体脂肪细胞,48 h 后于荧光显微镜下观察 GFP 蛋白的表达情况,结果(图 4)显示,

大约有 65% 的细胞表达 GFP 蛋白。

2.3 pLentiH1-Sirt1 shRNA 对猪前体脂肪细胞 *Sirt1* 蛋白表达的影响

利用 Western 印迹检测重组慢病毒颗粒感染猪前体脂肪细胞后 *Sirt1* 蛋白的表达情况,结果见图 5。由图 5 可以看出,感染 pLentiH1-Sirt1 shRNA 的猪前体脂肪细胞 *Sirt1* 蛋白的表达与空白对照组(未转染对照组)相比显著下降($P<0.05$),表达量仅为对照的 57%,而空白对照组与空载体对照组无统计学差异,说明 pLentiH1-Sirt1 shRNA 慢病毒载

体能有效地抑制猪 Sirt1 蛋白的表达。

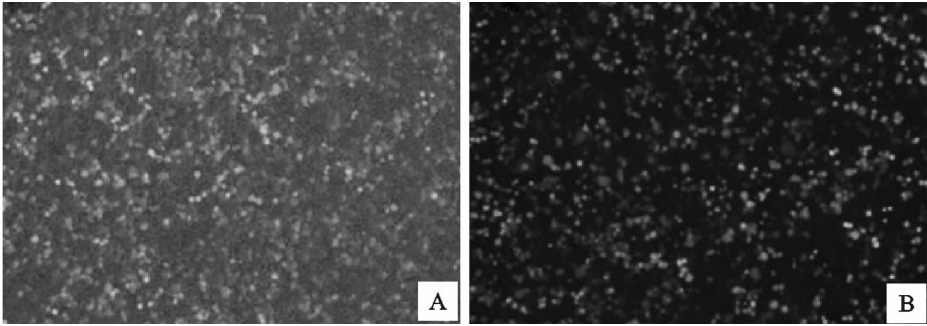


图 3 转染 pLentiH1-Sirt1 shRNA 293T 细胞的检测(40×)

A. 普通光学显微镜+荧光显微镜观察;B. 荧光显微镜观察

Fig. 3 pLentiH1-Sirt1 shRNA transfected to 293T cells(40×)

A. Observed under common microscope+fluorescence microscope;B. Observed under fluorescence microscope

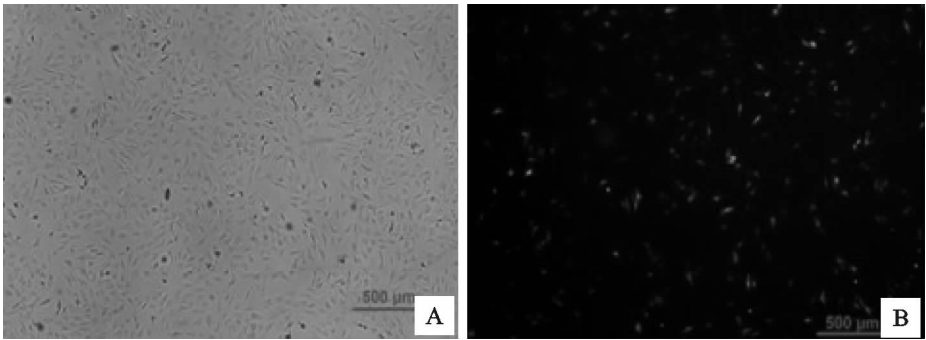


图 4 pLentiH1-Sirt1 shRNA 感染猪前体脂肪细胞 GFP 蛋白表达的检测(40×)

A. 普通光学显微镜观察;B. 荧光显微镜观察

Fig. 4 GFP expression of porcine preadipocytes after infected with lentivirus containing Sirt1 shRNA(40×)

A. Observed under common microscope;B. Observed under fluorescence microscope

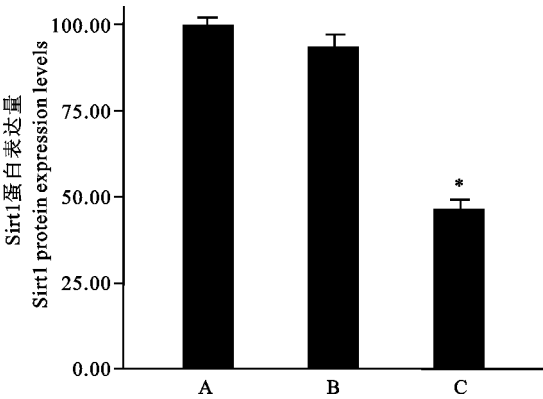


图 5 pLentiH1-Sirt1 shRNA 感染猪前体脂肪细胞对 Sirt1 蛋白表达的影响

A. 空白对照组;B. 空载体对照组;C. pLentiH1-Sirt1 shRNA 干扰组;
*. 与空白和空载体对照组相比差异显著($P<0.05$),下同

Fig. 5 Expression of Sirt1 protein after preadipocytes infected by pLentiH1-Sirt1 shRNA

A. Non-transfected group;B. Empty vector group;C. pLentiH1-Sirt1 shRNA interference group; *. Means significant difference compared with non-transfected group and empty vector group,the same below

2.4 Sirt1 对猪前体脂肪细胞凋亡的影响

采用 Hoechst 33258 染色,检测 pLentiH1-Sirt1 shRNA 重组慢病毒颗粒感染猪前体脂肪细胞后细胞的凋亡情况,结果见图 6。由图 6 可知,空白对照组细胞生长状态正常,细胞核体积较大、形态规整,核染色均匀、颜色较浅;空载体对照组与空白对照组相似,有少数凋亡细胞;而 plentiH1-Sirt1 shRNA 组细胞核缩小,出现凝集、断裂等现象,荧光染色增强,表现出明显的凋亡特征。

2.5 Sirt1 表达下调对细胞凋亡率的影响

使用 Annexin V-FITC/PI 双标法检测细胞凋亡情况。猪前体脂肪细胞经 pLentiH1-Sirt1 shRNA 病毒液处理 48 h 后出现明显凋亡,表现为活细胞数量减少,而死细胞和早、晚期凋亡细胞数量显著增多。采用 Cell Quest 软件计算各个时期细胞的凋亡百分率,结果见图 7。由图 7 可见,与空载体对照组相比,pLentiH1-Sirt1 shRNA 组活细胞百分率从 85%下降至 36%($P<0.05$),而早期凋亡细胞和晚

期凋亡细胞分别从 4%和 9%上升至 30%和 32% ($P<0.05$),死细胞百分率从 0.2%上升至 3% ($P<0.05$);空白对照组与空载体组相似,无明显细胞凋亡现象。

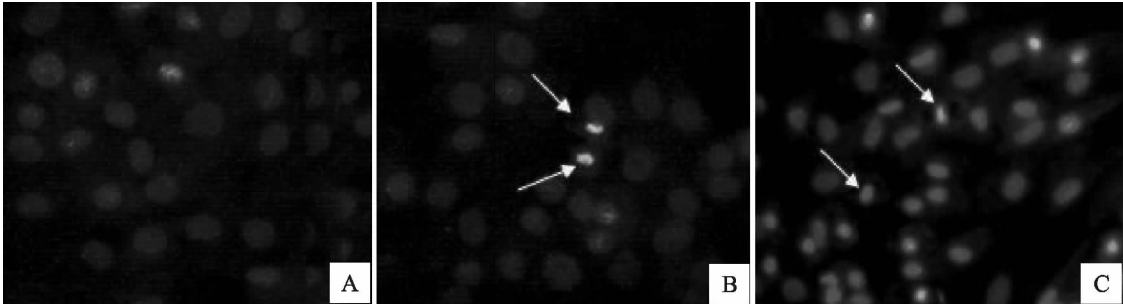


图 6 Hoechst 33258 染色检测 *Sirt1* 表达下调后猪前体脂肪细胞凋亡的形态学变化(100×)
A. 空白对照组;B. 空载体对照组;C. pLentiH1-*Sirt1* shRNA 干扰组;→. 示凋亡细胞

Fig. 6 Effect of *Sirt1* downregulation on apoptotic morphology of preadipocytes detected by Hoechst 33258 staining (100×)
A. Non-transfected group;B. Empty vector group;C. pLentiH1-*Sirt1* shRNA interference group;→. Indicate apoptotic cell

2.6 抑制 *Sirt1* 对 Cleaved caspase-3 表达的影响

用 Western 印迹检测重组慢病毒颗粒感染猪前体脂肪细胞 48 h 后 Cleaved caspase-3 的表达情况,结果见图 8。由图 8 可知,与空白对照组相比,空载体对照组 Cleaved caspase-3 表达轻微上调,而

pLentiH1-*Sirt1* shRNA 组 Cleaved caspase-3 蛋白表达量明显增多,其表达量是空白对照组的 3.2 倍,提示抑制 *Sirt1* 对猪前体脂肪细胞凋亡的影响与 Cleaved caspase-3 蛋白表达显著上调有关。

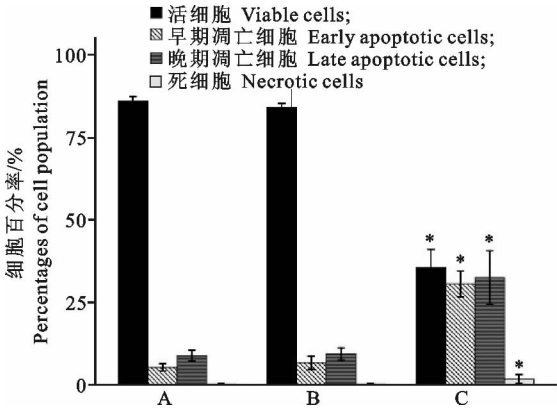


图 7 流式细胞术检测 *Sirt1* 表达下调对猪前体脂肪细胞凋亡的影响

A. 空白对照组;B. 空载体对照组;C. pLentiH1-*Sirt1* shRNA 干扰组

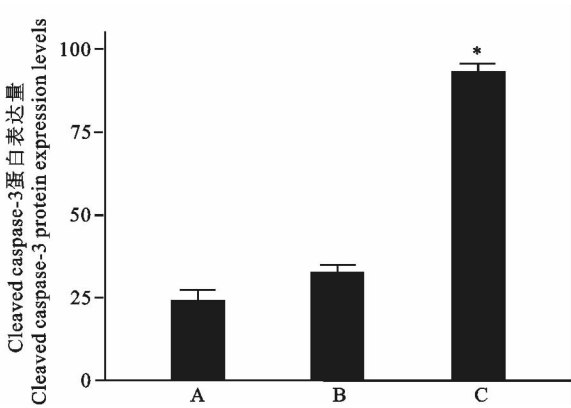


图 8 pLentiH1-*Sirt1* shRNA 感染猪前体脂肪细胞对 Cleaved caspase-3 蛋白表达的影响

A. 空白对照组;B. 空载体对照组;C. pLentiH1-*Sirt1* shRNA 干扰组

Fig. 7 Flow cytometric analysis of downregulation of *Sirt1* induced apoptosis in porcine preadipocytes
A. Non-transfected group;B. Empty vector group;
C. pLentiH1-*Sirt1* shRNA interference group

Fig. 8 Expression of Cleaved caspase-3 protein after preadipocytes infected by pLentiH1-*Sirt1* shRNA
A. Non-transfected group;B. Empty vector group;
C. pLentiH1-*Sirt1* shRNA interference group

3 讨 论

肥胖是由于体内能量代谢平衡被打破而造成的。研究证实白色脂肪组织在调节能量代谢平衡中起重要作用^[10],适量的脂肪是保证个体正常发育所必需的,而脂肪的过度沉积会引起肥胖及相关疾病的发生。脂肪组织的生长是前体脂肪细胞增殖、分化和凋亡共同作用的结果^[11],因此通过调节前体脂

肪细胞凋亡来调整脂肪细胞数目被认为是减少体脂沉积的有效手段^[12]。有研究表明,辣椒碱以时间和浓度依赖性方式诱导 3T3-L1 前体脂肪细胞的凋亡,细胞数目显著减少,细胞中抗凋亡基因 *Bcl-2* 表达下降,促凋亡基因 *Bax* 和 *Bak* 表达量明显增加^[5]。Papineau 等^[6]研究表明,血清饥饿 24 h,可显著诱导人原代前体脂肪细胞的凋亡,但其作用机制还不清楚。

猪是自然肥胖程度最高的动物,与人类的生理特性最为接近,可作为研究人类肥胖及相关代谢疾病的理想模型^[13]。因此,揭示猪前体脂肪细胞凋亡的分子机理,可以为通过控制前体脂肪细胞凋亡而达到减肥降脂的目的提供新思路。本研究用 pLentiH1-Sirt1 shRNA 慢病毒感染猪前体脂肪细胞,Western 印迹检测表明该载体在蛋白质水平上特异性地抑制了 Sirt1 蛋白的表达,同时还出现细胞核缩小、染色质凝集等典型的凋亡特征,凋亡早期、晚期和死细胞的数量显著增加,凋亡百分率明显增大,说明抑制 Sirt1 可诱导猪前体脂肪细胞凋亡。近年来的研究表明,Sirt1 是细胞凋亡的重要调控因子。Sun 等^[14]研究发现,使用反义寡核苷酸下调 Sirt1 表达后能显著增强 caspase-3/7 的活性,诱发 A549 肺癌细胞凋亡,并增强其对放疗的敏感性。Chen 等^[15]将鼠 H9c2 细胞置于缺氧环境下 24 h 后,TUNEL、流式细胞术检测发现细胞凋亡增加,而相同条件下再用 Sirt1 激活剂白藜芦醇处理 24 h,凋亡细胞明显减少。Jeong 等^[16]发现,在辐射状态下,Sirt1 与 Ku70 共同定位于染色质断裂位点形成 Sirt1-Ku70 复合物而调节 Ku70 脱乙酰基,促进断裂 DNA 的修复,减少 Q293A 细胞的凋亡。本研究结果与上述研究结果相同,证明 Sirt1 是调控细胞凋亡的关键因子。

细胞凋亡是多基因时序表达调控的结果。参与细胞凋亡调控的关键基因 *caspase-3*,是细胞凋亡的最终执行者,正常情况下,胞质中的 *caspase-3* 以无活性的酶原形式存在,只有当细胞凋亡时,才被激活为有活性的 Cleaved *caspase-3*,直接裂解多个重要的结构和功能蛋白,从而启动细胞凋亡^[17]。本试验发现,经 Sirt1 shRNA 病毒液处理后,猪前体脂肪细胞 Cleaved *caspase-3* 的表达显著高于对照组,推测 Sirt1 表达下调诱导的前体脂肪细胞凋亡是通过活化 *caspase-3* 实现的。

Sirt1 不仅可使组蛋白脱乙酰化,而且可以使 p53、Ku70、FoxOs 等非组蛋白脱乙酰化而抑制细胞凋亡。与之不同的是,Yeung 等^[18]发现,Sirt1 脱乙酰化修饰 RelA/p65 蛋白 310 位赖氨酸基抑制 NF- κ B 的转录活性,促进 TNF α 诱导的细胞凋亡。因此,Sirt1 对细胞凋亡的功能调节是复杂的反馈调节过程,既有抗凋亡作用,又有促凋亡作用^[19],推测其原因可能是由于物种差异或细胞类型不同所致,也有可能是 Sirt1 介导凋亡的通路不同造成的。

本试验用 pLentiH1-Sirt1 shRNA 慢病毒载体

感染猪前体脂肪细胞,运用形态学观察、流式细胞术、Western 印迹检测初步证实,Sirt1 表达下调会促进猪前体脂肪细胞凋亡,这种促凋亡作用是通过激活 *caspase-3* 凋亡通路实现的。*caspase-3* 诱导细胞凋亡的途径有 2 种:一种是线粒体依赖性途径,另一种是死亡受体介导的信号传导途径^[20]。Sirt1 通过哪条途径激活 *caspase-3* 诱导猪前体脂肪细胞的凋亡,以及其作用机制如何,均有待于进一步研究。

[参考文献]

- [1] Gesta S, Tseng Y H, Kahn C R, et al. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source [J]. *Cell*, 2007, 131: 242-256.
- [2] Furuyashiki T, Nagayasu H, Aoki Y, et al. Tea catechin suppresses adipocyte differentiation accompanied by down-regulation of PPARgamma2 and C/EBPalpha in 3T3-L1 cells [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2004, 68: 2353-2359.
- [3] Miller W H J, Faust I M, Goldberger A C, et al. Effects of severe long-term food deprivation and refeeding on adipose tissue cells in the rat [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 1983, 245: E74-E80.
- [4] Prins J B, Walker N I, Winterford C M, et al. Apoptosis of human adipocytes *in vitro* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, 201: 500-507.
- [5] Hsu C L, Yen G C. Effects of capsaicin on induction of apoptosis and inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 cells [J]. *J Agric Food Chem*, 2007, 55: 1730-1736.
- [6] Papineau D G A, Sorisky A. Apoptosis of human abdominal preadipocytes before and after differentiation into adipocytes in culture [J]. *Metabolism*, 2003, 52: 987-992.
- [7] Sun X C, Zemel M B. Role of uncoupling protein 2 (Ucp2) expression and 1 Alpha, 25-dihydroxyvitamin D-3 in modulating adipocyte apoptosis [J]. *FASEB J*, 2004, 18(10): 1430-1432.
- [8] Zhang Q, Piston D W, Goodman R H. Regulation of corepressor function by nuclear NADH [J]. *Science*, 2002, 295: 1895-1897.
- [9] Picard F, Kurtev M, Chung N, et al. Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR- γ [J]. *Nature*, 2004, 429(6993): 771-776.
- [10] Kopelman P G. Obesity as a medical problem [J]. *Nature*, 2000, 404: 635-643.
- [11] 罗肖, 李惠侠, 杨公社. Wnt 信号通路与前体脂肪细胞 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2007, 23(10): 791-796.
Luo X, Li H X, Yang G S. Wnt signaling pathway and preadipocytes [J]. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2007, 23(10): 791-796. (in Chinese)
- [12] Wang Y W, Jones P J. Conjugated linoleic acid and obesity control: efficacy and mechanisms [J]. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2004, 28: 941-955.
- [13] Belling D A, Merricks E P, Nichols T C. Swine models of type

2 diabetes mellitus, insulin resistance, glucose tolerance, and cardiovascular complication [J]. ILAR J, 2006, 47 (3): 243-258.

[14] Sun Y, Sun D, Li F, et al. Downregulation of Sirt1 by anti-sense oligonucleotides induces apoptosis and enhances radiation sensitization in A549 lung cancer cells [J]. Lung Cancer, 2007, 58: 21-29.

[15] Chen C J, Yu W, Fu Y C, et al. Resveratrol protects cardiomyocytes from hypoxia-induced apoptosis through the SIRT1-FoxO1 pathway [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 378: 389-393.

[16] Jeong J, Juhn K, Lee H, et al. Sirt1 promotes DNA repair activity and deacetylation of Ku70 [J]. Exp Mol Med, 2007, 39 (1): 8-13.

[17] Ditzle M, Broemer M, Tenev T, et al. Inactivation of effector caspases through nondegradative polyubiquitylation [J]. Mol Cell, 2008, 32: 540-553.

[18] Yeung F, Hoberg J E, Ramsey C S, et al. Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the Sirt1 deacetylase [J]. EMBO J, 2004, 23(12): 2369-2380.

[19] Jin Q, Yan T, Ge X, et al. Cytoplasm-localized Sirt1 enhances apoptosis [J]. J Cell Physiol, 2007, 213(1): 88-97.

[20] Swanton E, Savory P, Cosulich S, et al. Bcl-2 regulates a caspase-3/caspase-2 apoptotic cascade in cytosolic extracts [J]. Oncogene, 1999, 18: 1781-1787.

(上接第 30 页)

[10] 吴乃虎. 基因工程原理 [M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 1998.

Wu N H. Gene engineering principle [M]. 2nd edition. Beijing: Science Press, 1998. (in Chinese)

[11] 何宏轩, 张西臣, 李建华, 等. 微小隐孢子虫 Cp15/60 DNA 滴鼻免疫小鼠诱导的粘膜与系统免疫反应 [J]. 中国农业大学学报, 2002, 7(5): 112-116.

He H X, Zhang X C, Li J H, et al. Mucosal and systemic immune response induced in BALB/c Mice by intranasal immunization with Cp15/60-DNA [J]. Journal of China Agricultural University, 2002, 7(5): 112-116. (in Chinese)

[12] Cevallos A M, Zhang X, Fayer R, et al. Molecularcloning and expression of a gene encoding *Cryptosporidium parvum* glycoproteins Cpgp40/15 [J]. Infect Immun, 2000, 68: 4180-4186.

[13] 陶艳琳, 程训佳. 微小隐孢子虫致病相关蛋白的研究进展 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2004, 22(4): 253-255.

Tao Y L, Cheng X J. Research advances in the pathogenicity associated proteins of *Cryptosporidium parvum* [J]. Chinese Journal of Parasitology and Parasitinc Diseases, 2004, 22(4): 253-255. (in Chinese)

[14] 薛 霞, 范作良, 张西臣, 等. 微小隐孢子虫 *Cpgp40/15* 基因真核表达重组质粒诱导 BALB/c 小鼠的免疫应答 [J]. 中国寄生虫病防治杂志, 2005, 18(3): 197-199.

Xue X, Fan Z L, Zhang X C, et al. Immune responses in BALB/c mice vaccinated with recombinant plasmid pVAX1-*Cpgp40/15* [J]. Chinese Journal of Parasitic Disease Control, 2005, 18(3): 197-199. (in Chinese)

[15] 何宏轩, 张西臣, 尹继刚, 等. 微小隐孢子虫孢子表面蛋白质粒 DNA 接诱导 Balb/c 小鼠的免疫应 [J]. 免疫学杂志, 2002, 18(4): 263-265.

He H X, Zhang X C, Yin J G, et al. Humoral and cellular immune responses in the mice induced with DNA vaccines of sporozoites surface protein of *Cryptosporidium parvum* [J]. Immunological Journal, 2002, 18(4): 263-265. (in Chinese)