

数量大,易于培养扩增,又具有细胞产量高、衰减速度慢、无免疫原性,无伦理学困扰等优势,成为最具吸引力的干细胞来源之一^[7,8]。

参考文献

- 1 Yan P, Nagasawa A, Uosaki H, *et al.* Cyclosporin - A potently induces highly cardiogenic progenitors from embryonic stem cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 379(1): 115 - 120
- 2 Masataka F, Peishi Y, Tomomi O, *et al.* Induction and enhancement of cardiac cell differentiation from mouse and human induced pluripotent stem cells with cyclosporin - A[J]. *PLoS ONE*, 2011, 2(22): 1 - 10
- 3 Andrukhov O, Matejka M, Rausch FX. Effect of cyclosporin A on proliferation and differentiation of human periodontal ligament cells[J]. *Acta Odontologica Scandinavica*, 2010, 68(6): 329 - 334
- 4 Cotrim P, Martelli - Junior H, Graner E, *et al.* Cyclosporin A induces proliferation in human gingival fibroblasts via induction of transforming growth factor - beta1[J]. *J Periodontol*, 2003, 74(11): 1625 - 1633

- 5 Gomez L, Thibault H, Gharib A, *et al.* Inhibition of mitochondrial permeability transition improves functional recovery and reduces mortality following acute myocardial infarction in mice[J]. *Heart Circ Physiol*, 2007, 293(3): H1654 - H1661
- 6 Piot C, Croisille P, Staat P, *et al.* Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction[J]. *N Engl J Med*, 2008, 359(5): 473 - 481
- 7 Poglio S, De Toni - Costes F, Arnaud E, *et al.* Adipose tissue as a dedicated reservoir of functional mast cell progenitors[J]. *Stem Cells*, 2010, 28(11): 2065 - 2072
- 8 Shi CZ, Zhang XP, Lv ZW, *et al.* Adipose tissue - derived stem cells embedded with eNOS restore cardiac function in acute myocardial infarction model[J]. *Int J Cardiol*, 2012, 154(1): 2 - 8

(收稿:2012 - 04 - 25)

(修回:2012 - 06 - 12)

吡格列酮和高脂喂养对 SD 大鼠 SIRT6 表达的影响

章建梅 徐 森 韩俊峰 陆俊茜 刘若冰 魏 丽 贾伟平

摘 要 **目的** 观察吡格列酮和高脂喂养对 SD 大鼠附睾脂肪组织、肝脏和肌肉 SIRT6 表达的影响。**方法** 24 只雄性 SD 大鼠随机分为 3 组:空白对照组(NC)、单纯高脂饮食组(HF)、高脂 + 吡格列酮组(FP)。RT - PCR 及 Western blot 方法检测附睾脂肪组织、肝脏和肌肉 SIRT6 表达。**结果** (1)与 NC 组相比, HF 组大鼠体重、空腹血糖、胰岛素、甘油三酯、总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇均明显升高($P < 0.05$), 高密度脂蛋白胆固醇则明显下降($P < 0.01$)。与 HF 组相比, FP 组大鼠体重、空腹血糖、胰岛素、甘油三酯、总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇明显下降($P < 0.05$)。(2)与正常对照组比较, HF 组大鼠附睾脂肪组织、肌肉和肝脏 SIRT6 mRNA 及蛋白表达轻度下降。吡格列酮治疗后, 上述组织 SIRT6 mRNA 及蛋白表达均显著增高($P < 0.05$)。**结论** 高脂饮食可诱导大鼠糖脂代谢紊乱, 轻度降低 SIRT6 的表达, 吡格列酮改善糖脂代谢紊乱可能通过上调 SIRT6 的表达。

关键词 SIRT6 吡格列酮 高脂 SD 大鼠

Effect of Pioglitazone and High - fat Diet on Expression of SIRT6 in SD Rats. Zhang Jianmei, Xu Miao, Han Junfeng, Lu Junxi, Liu Ruobing, Wei Li, Jia Weiping. Department of Endocrinology and Metabolism, Shanghai Sixth People's Hospital Affiliated to Jiaotong University, Shanghai 200233, China

Abstract **Objective** To observe the effects of pioglitazone and high - fat diet on the expression of SIRT6 in epididymal fat tissue, liver and muscle of SD rats. **Methods** SD rat models were established with high - fat diet, and 24 male rats were assigned to 3 groups including high - fat diet (HF group), high - fat diet with pioglitazone (FP group), and control rats with normal diet (NC group). Expressions of SIRT6 in epididymal fat tissue, liver and muscle were detected by RT - PCR and Western blotting. **Results** (1) The levels of body weight, fasting blood glucose, insulin, triglyceride, total cholesterol and low - density lipoprotein cholesterol were higher in HF group than in NC group ($P < 0.05$), but high - density lipoprotein cholesterol decreased significantly. Compared with HF group, body weight, fasting blood glucose, insulin, triglyceride, total cholesterol and low - density lipoprotein cholesterol decreased markedly in FP group ($P < 0.05$); (2) The mRNA and protein expressions of SIRT6 in epididymal fat tissue, liver and muscle were slightly decreased in HF group compared with those in NC group. After pioglitazone treatment, SIRT6 mRNA and protein expression were increased in epididymal fat tissue, liver

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30670989);上海市糖尿病重点实验室项目(08DZ2230200)

作者单位:200233 上海交通大学附属第六人民医院内分泌代谢科

通讯作者:魏丽, 电子信箱:weili63@hotmail.com

and muscle ($P < 0.05$). **Conclusion** The SD rats fed with high-fat diets develop glucose and lipid metabolic disorders with slightly decreased SIRT6 expressions, Pioglitazone may improve glucose and lipid metabolic disorders by increasing expressions of SIRT6.

Key words SIRT6; Pioglitazone; High-fat; SD rat

SIRT6 由 Fyre 1999 年发现, 是一种在哺乳动物的多个组织中广泛表达的细胞因子, 为组蛋白 H3K9 去乙酰化酶和 ADP-核糖基转移酶, 具有抗衰老、抑制炎症等作用^[1-4]。新近的研究发现其与糖脂代谢密切相关, 而对其的调控研究却知之甚少。关于糖脂代谢异常是否会引起 SIRT6 表达的改变及治疗糖脂代谢异常的药物又是否影响 SIRT6 目前研究较少。本研究拟通过高脂喂养建立肥胖 SD 大鼠模型并用吡格列酮干预来观察 SIRT6 表达的改变, 观察高脂和 PPAR- γ 激动剂对 SIRT6 表达的影响, 为深入了解 SIRT6 的调控机制提供依据。

材料与方法

1. 动物模型的建立及分组: 8 周龄、体重约 200g 雄性清洁级 SD 大鼠(上海西普尔-必凯实验动物有限公司)24 只适应性喂养 1 周后随机分为: 普通对照组(NC)8 只, 高脂组 16 只。每周记录体重、摄食量和饮水量。NC 组给予普通饲料, 高脂组给予高脂饲料。普通饲料总热量为 380kJ/100g, 其中糖类占 55%, 脂肪占 24%, 蛋白质占 21%。高脂饲料总热量为 520kJ/100g, 其中糖类占 20%, 脂肪占 59%, 蛋白质占 21%。高脂组喂养 8 周后, 再随机分为两组: 高脂饮食组(HF)和吡格列酮(日本武田公司)治疗组(FP), 每组 8 只。FP 组予吡格列酮 20mg/(kg·d)灌胃, NC 组和 HF 组相应予溶剂灌胃, 灌胃 4 周^[5]。

2. 标本收集及处理: 12 周后处死大鼠, 死前静脉采血, 收集血清, -80°C 保存待测。摘取附睾周围脂肪、肝脏以及肌肉组织, -80°C 保存备用。

3. 大鼠血脂、血糖的测定: 大鼠禁食 12h 后空腹血糖由强生血糖仪测尾尖血两次取平均值获得, 空腹胰岛素采用酶联免疫法(mercodia 公司)。Glamour 2000 全自动检测分析仪测定胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)及低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)。

4. RT-PCR: Trizol (Invitrogen 公司)法提取总 RNA, 反转录为 cDNA (Epicentre 公司反转录试剂盒)。根据 SIRT6 和管家基因 18S 的基因序列, 设定上、下游引物。SIRT6: 上游引物

5'-gccgtctgtgctattgca-3', 下游引物 5'-agccttggtgctactgg-3' (191bp); 18S: 上游引物 5'-gtaaccggtgaacccatt-3', 下游引物 5'-ccatccaatcgtagtagcg-3' (151bp)。SIRT6 的反应条件: 95°C 预变性 5min, 95°C 变性 30s, 56°C 退火 30s, 72°C 延伸 40s, 30 个循环, 72°C 延伸 10min。18S 的反应条件: 95°C 预变性 5min, 95°C 变性 30s, 60°C 退火 30s, 72°C 延伸 40s, 30 个循环, 72°C 延伸 10min。PCR 产物经电泳分析鉴定, 凝胶成像后结果应用灰度扫描仪分析 SIRT6 与对应的 18S 条带灰度的比值表示 SIRT6 的相对表达量。

5. Western blot: 用 RIPA 裂解液提取组织蛋白, 取 80 μg 蛋白质样品上样, 电泳及转膜。膜与 SIRT6 抗体(abcam 公司) 1:1000、 β -actin 抗体 1:800、ERK 抗体 1:1000, 4°C 过夜。II 抗 (1:2500) 室温下与膜进行杂交 1h。ECL 显色, 摄取图像。应用灰度扫描仪分析 SIRT6 与对应的 β -actin/erk 条带灰度的比值表示其相对表达量。

6. 统计学方法: 应用 SPSS 16.0 统计软件, 所有数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用配对 t 检验及单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 各组大鼠体脂和血脂谱差异: 12 周后, HF 组大鼠体重、FINS、FBG、TC、TG 和 LDL-C 均明显高于 NC 组 (P 均 < 0.05), HDL-C 较 NC 组明显下降 ($P < 0.01$)。与 HF 组相比, FP 组大鼠体重、FINS、FBG、TC、TG、LDL-C 均下降, 差异有显著性 (P 均 < 0.05 , 表 1)。

2. 高脂和吡格列酮对 SIRT6 表达的影响: SIRT6 在大鼠附睾脂肪、肝脏及肌肉组织均有表达。与 NC 组相比, HF 组大鼠附睾脂肪、肝脏、肌肉组织中的 SIRT6 蛋白及 mRNA 轻度下降。而吡格列酮治疗后, 大鼠附睾脂肪、肝脏、肌肉组织中的 SIRT6 mRNA 与 HF 组相比分别上升 1.51 倍、2.07 倍、1.72 倍 ($P < 0.05$); 大鼠附睾脂肪、肝脏、肌肉组织中的 SIRT6 蛋白与 HF 组相比分别上升 1.44 倍、1.89 倍、1.33 倍 ($P < 0.05$, 图 1、图 2)。

表 1 各组间大鼠体重和血生化指标的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	体重(g)	FINS ($\mu\text{g/L}$)	FBG (mmol/L)	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)
NC ($n=8$)	430 $\pm$ 32.6	0.59 $\pm$ 0.16	4.10 $\pm$ 0.19	1.16 $\pm$ 0.11	0.63 $\pm$ 0.15	0.69 $\pm$ 0.17	0.16 $\pm$ 0.08
HF ($n=8$)	500 $\pm$ 10.9 [*]	1.18 $\pm$ 0.06 [*]	5.45 $\pm$ 0.16 [*]	2.20 $\pm$ 0.27 [*]	0.98 $\pm$ 0.31 [*]	0.51 $\pm$ 0.20 [*]	0.31 $\pm$ 0.12 [*]
FP ($n=8$)	480 $\pm$ 17.1 [#]	0.81 $\pm$ 0.20 [#]	4.56 $\pm$ 0.35 [#]	1.29 $\pm$ 0.29 [#]	0.72 $\pm$ 0.10 [#]	0.60 $\pm$ 0.26	0.14 $\pm$ 0.10 ^Δ

NC. 对照组; HF. 高脂饮食组; FP. 高脂饮食 + 吡格列酮组; FINS. 空腹胰岛素; FBG. 空腹血糖; TG. 甘油三酯; TC. 总胆固醇; HDL-C. 高密度脂蛋白胆固醇; LDL-C. 低密度脂蛋白胆固醇; 与 NC 组比较, ^{*} $P < 0.01$; 与 HF 组比较, [#] $P < 0.05$, ^Δ $P < 0.01$

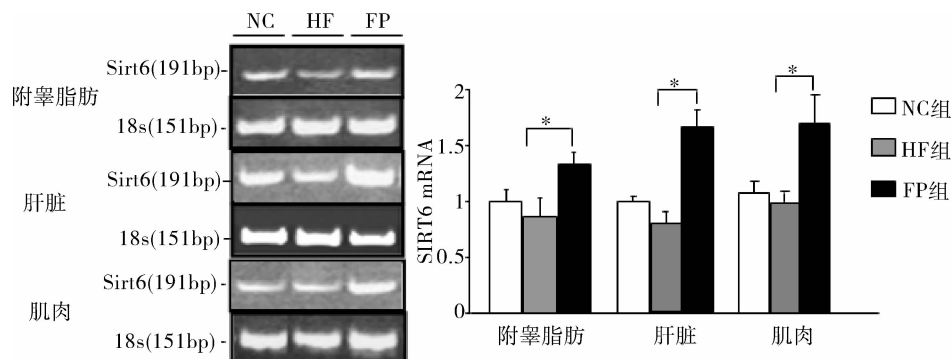


图 1 附睾脂肪、肝脏、肌肉组织 SIRT6 mRNA 的表达 ($n = 4$, * $P < 0.05$)

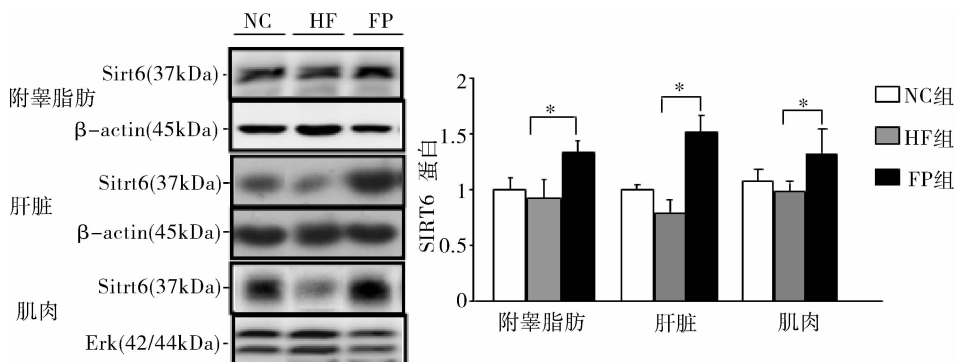


图 2 附睾脂肪、肝脏、肌肉组织 SIRT6 蛋白的表达 ($n = 6$, * $P < 0.05$)

讨 论

肥胖是体内脂肪,尤其是甘油三酯积聚过多而导致的一种状态,肥胖者的细胞肥大且数量增多,可导致某些激素的表达增强或减弱,从不同层次影响糖脂代谢,形成糖脂代谢紊乱。SIRT6 是一种由 355 个氨基酸残基组成的核蛋白,基因定位于 19p13.3,它跨越了 8427bp 的区域,由 8 个外显子和 7 个内含子组成^[1]。Mostoslavsky 等^[2]发现 SIRT6 基因缺陷小鼠产后四周表现为皮下脂肪减少、低血 IGF-1 及致死性血糖。Zhong 等^[3]的研究发现,SIRT6 敲除使得糖酵解关键酶启动子上组蛋白乙酰化,使 DNA 与组蛋白结合松弛,从而促进这些酶转录活性增加,使血糖进入外周组织细胞参与糖酵解,引起血糖降低。Kim 等^[4]观察到,肝脏特异性 SIRT6 敲除的小鼠脂肪合成增加而氧化减少,最终小鼠发展为脂肪肝。另一方面 Kanfi 等^[5]也发现过表达 SIRT6 可抑制高脂饮食引起的肥胖,提示 SIRT6 参与糖脂代谢的调节。目前对 SIRT6 的表达调控方面的研究较少。我们知道 SIRT6 对糖脂代谢有着重要的作用,而吡格列酮是治疗糖脂代谢异常的常用药物。吡格列酮为 PPAR- γ 激动剂,通过激动 PPAR- γ 对许多基因起着调控作用。

因此我们观察了高脂和 PPAR- γ 对 SIRT6 表达的影响。

本研究发现高脂饲喂后大鼠的体重、FINS、FBG、TC、TG 和 LDL-C 均明显升高 ($P < 0.05$),HDL-C 则明显下降,而吡格列酮干预后大鼠的体重、FINS、FBG、TC、TG 和 LDL-C 均下降,差异有显著性 ($P < 0.05$)。提示吡格列酮除具有明显降糖作用外,还具有明显的调脂作用。

研究显示热量限制或禁食后 SIRT6 表达明显升高,但高脂对 SIRT6 表达的影响尚有争议:如有研究显示高脂饮食大鼠 SIRT6 蛋白轻度降低;而 Palmer 等^[6]却发现高脂饮食小鼠 SIRT6 蛋白明显下降 ($P < 0.05$)。本研究发现高脂喂养后,虽然大鼠附睾脂肪、肝脏及肌肉组织中 SIRT6 蛋白和 mRNA 表达有所下降,但没有显著性差异,推测高脂对 SIRT6 的影响可能存在种属间差异。

我们的实验结果显示 PPAR- γ 可以上调大鼠附睾脂肪、肝脏、肌肉组织中的 SIRT6 mRNA 和蛋白的表达。PPAR- γ 激动剂吡格列酮治疗后,大鼠附睾脂肪、肝脏、肌肉组织中的 SIRT6 mRNA 与 HF 组相比分别上升 1.51 倍、2.07 倍、1.72 倍 ($P <$

0.05)。而大鼠附睾脂肪、肝脏、肌肉组织中的 SIRT6 蛋白与 HF 组相比分别上升 1.44 倍、1.89 倍、1.33 倍 ($P < 0.05$)。本实验发现吡格列酮可从 mRNA 及蛋白水平影响 SIRT6 的表达,推测吡格列酮的降糖、调脂作用可能经由上调 SIRT6 的表达来起作用的。本实验结果还发现吡格列酮治疗后肝脏组织 SIRT6 mRNA 及蛋白上升最显著,推测吡格列酮主要上调肝脏 SIRT6 影响肝脏糖脂代谢从而起着降糖调脂的作用。Yang 等^[7]的实验也显示罗格列酮可改善肝纤维化,促进 OLETF 小鼠肝脏 SIRT6 表达,本实验结果与其一致。Kim 等^[4]的实验结果也提示肝脏特异性 SIRT6 敲除的小鼠最终小鼠发展为脂肪肝。

总之,本研究通过对高脂喂养及吡格列酮干预后大鼠各组织 SIRT6 表达水平的观察,发现高脂喂养降低 SIRT6 的表达,而吡格列酮治疗后可逆转 SIRT6 的表达,且血糖血脂明显改善,推测吡格列酮通过激动 PPAR γ 上调 SIRT6 的表达从而影响糖脂代谢,但 PPAR γ 对 SIRT6 的具体调控机制还有待细胞水平的进一步分析。

参考文献

- 1 Frye RA. Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 273(2): 793-798
- 2 Mostoslavsky R, Chua KF, Lombard DB, et al. Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6[J]. Cell, 2006, 124(2): 315-329
- 3 Zhong L, D'Urso A, Toiber D, et al. The histone deacetylase Sirt6 regulates glucose homeostasis via Hif1alpha[J]. Cell, 2010, 140(2): 280-293
- 4 Kim HS, Xiao C, Wang RH, et al. Hepatic-specific disruption of SIRT6 in mice results in fatty liver formation due to enhanced glycolysis and triglyceride synthesis[J]. Cell Metab, 2010, 12(3): 224-236
- 5 Kanfi Y, Peshti V, Gil R, et al. SIRT6 protects against pathological damage caused by diet-induced obesity[J]. Aging Cell, 2010, 9(2): 162-173
- 6 Palmer NO, Fullston T, Mitchell M, et al. SIRT6 in mouse spermatogenesis is modulated by diet-induced obesity[J]. Reprod Fertil Dev, 2011, 23(7): 929-939
- 7 Yang SJ, Choi JM, Chae SW, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by rosiglitazone increases sirt6 expression and ameliorates hepatic steatosis in rats[J]. PLoS One, 2011, 6(2): e17057

(收稿:2012-04-20)

(修回:2012-05-02)

艾滋病并发血流感染的临床分析

励 峰 朱翠云 黄 琴 孙洪清

摘 要 **目的** 探讨艾滋病患者血流感染的病原菌分布,与外周血细胞的相关性及其对预后的影响。**方法** 回顾性分析 2011 年 1 月~2012 年 3 月在上海市公共卫生临床中心感染科住院的艾滋病并发血流感染的发病率、病原菌分布、与外周血细胞、外周血淋巴细胞计数的相关性以及病死率。**结果** 144 例艾滋病患者中确诊血流感染(血流感染组)有 19.4% (28/144),无血流感染(无血流感染组)有 80.6% (116/144)。培养出 33 株病原菌,主要是葡萄球菌 8 株(24.2%);真菌 6 株(18.2%);沙门菌 6 株(18.2%)。血流感染组平均红细胞计数及血红蛋白分别为 $3.223 \times 10^{12}/L$ 、98.89g/L,无血流感染组分别为 $3.678 \times 10^{12}/L$ 、109.94g/L,差异有统计学意义(P 分别为 0.016 和 0.049)。血流感染组 CD4⁺T 淋巴细胞计数 $78.3 \times 10^6/L$,无血流感染组 CD4⁺T 淋巴细胞计数 $98.75 \times 10^6/L$,两组比较差异无统计学意义($P = 0.422$)。血流感染组病死率 32.1%,无血流感染组病死率 12.1%,两组比较差异有统计学意义($\chi^2 = 6.772$, $P = 0.009$)。**结论** 艾滋病患者并发血流感染的病原菌以葡萄球菌为常见,外周红细胞和血红蛋白低更易并发血流感染,且病死率高。需要积极防治血流感染的发生。

关键词 艾滋病患者 外周血淋巴细胞计数 血流感染

Bloodstream Infections among AIDS Patients. Li Feng, Zhu Cuiyun, Huang qin, Sun Hongqing. Cao Jiadu Community Health Center of Shanghai Jingan District, Shanghai 200042, China

Abstract Objective To analyze the bloodstream infections(BSI) among AIDS patients, and study its peripheral blood routine test,

基金项目:国家科技重大专项基金资助项目(2008ZX10001-008);卫生部艾滋病防治研究基金资助项目(WA-2007-05)

作者单位:200042 上海市静安区曹家渡社区卫生服务中心(励峰);上海市公共卫生临床中心感染科(朱翠云、黄琴、孙洪清)

通讯作者:孙洪清,电子邮箱:sunhongqing1952@yahoo.com.cn