

增加可溶性 RAGE,从而直接或间接参与 sRANKL 诱导的破骨细胞生成。综合研究结果和相关文献报道,本研究推测 S100A4 和 S100A6 蛋白可能参与调控破骨细胞过程。

综上所述,S100 蛋白可能参与调控绝经后骨质疏松症的发病机制。本研究从转录水平上检测 S100A4 和 S100A6 蛋白在成骨细胞和破骨细胞形成中表达结果,笔者推测 S100A4 蛋白既参与调控成骨过程,又参与调控破骨过程;而 S100A6 可能仅参与调控破骨过程,今后将进一步探讨 S100A4 和 S100A6 蛋白对绝经后骨质疏松的作用机制,以及在临床上验证 S100A4 和 S100A6 蛋白在骨质疏松标本中表达及意义。

参考文献

- 1 Kanis JA, Black D, Cooper C, *et al.* A new approach to the development of assessment guidelines for osteoporosis[J]. *Osteoporos Int*, 2002,13(7):527-536
- 2 Karsenty G, Wagner EF. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development[J]. *Dev Cell*, 2002,2(4):389-406
- 3 Ma X, Yang Y, Wang Y, *et al.* Small interfering RNA-directed knockdown of S100A4 decreases proliferation and invasiveness of osteosarcoma cells[J]. *Cancer Lett*, 2010,299(2):171-181
- 4 Yamaguchi F, Umeda Y, Shimamoto S, *et al.* S100 proteins modulate protein phosphatase 5 function: a link between CA^{2+} signal transduction and protein dephosphorylation[J]. *J Biol Chem*, 2012,287(17):13787-13798
- 5 Donato R, Cannon BR, Sorci G, *et al.* Functions of S100 proteins

- [J]. *Curr Mol Med*, 2013,13(1):24-57
- 6 Duarte WR, Shibata T, Takenaga K, *et al.* Functions of S100 proteins[J]. *Curr Mol Med*, 2013,13(1):24-57
- 7 Hong D, Chen HX, Yu HQ, *et al.* Quantitative proteomic analysis of dexamethasone-induced effects on osteoblast differentiation, proliferation, and apoptosis in MC3T3-E1 cells using SILAC[J]. *Osteoporos Int*, 2011,22(7):2175-2186
- 8 Zhou J, He H, Yang L, *et al.* Effects of pulsed electromagnetic fields on bone mass and Wnt/beta-catenin signaling pathway in ovariectomized rats[J]. *Arch Med Res*, 2012,43(4):274-282
- 9 Chen J, Huang LQ, Xia QJ, *et al.* Effects of pulsed electromagnetic fields on the mRNA expression of CAII and RANK in ovariectomized rats[J]. *Rheumatol Int*, 2012,32(6):1527-1532
- 10 Li D, Zhang R, Zhu W, *et al.* S100A16 inhibits osteogenesis but stimulates adipogenesis[J]. *Mol Biol Rep*, 2013,40(5):3465-3473
- 11 Yoshida T, Flegler A, Kozlov A, *et al.* Direct inhibitory and indirect stimulatory effects of RAGE ligand S100 on sRANKL-induced osteoclastogenesis[J]. *J Cell Biochem*, 2009,107(5):917-925
- 12 Kato C, Kojima T, Komaki M, *et al.* S100A4 inhibition by RNAi up-regulates osteoblast related genes in periodontal ligament cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005,326(1):147-153
- 13 Komori T. Regulation of osteoblast differentiation by Runx2[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2010,658:43-49
- 14 Lee SH, Choi YH, Kim YJ, *et al.* Prolyl isomerase Pin1 enhances osteoblast differentiation through Runx2 regulation[J]. *FEBS Lett*, 2013,587(22):3640-3647
- 15 Koch FP, Merkel C, Ziebart T, *et al.* Influence of bisphosphonates on the osteoblast RANKL and OPG gene expression in vitro[J]. *Clin Oral Investig*, 2012,16(1):79-86

(收稿日期:2019-09-16)

(修回日期:2019-11-01)

靶向 MSTN 基因 shRNA 表达载体的构建与鉴定

王丽俊 钮利喜

摘要 旨在构建靶向 MSTN 基因的短发夹 RNA (shRNA) 真核表达载体,并鉴定其在小鼠体内的抑制效果。方法根据 MSTN 基因的 mRNA 序列(NM_010834.3)设计 siRNA,并挑选出 3 条可能具有良好干扰效果的 siRNA,设计合成 shRNA,构建 pSIREN-MSTN-shRNA 表达载体。通过肌肉注射法将载体递送至小鼠体内,利用实时荧光定量 PCR 和 Western blot 法检测干扰后小鼠肌肉组织中 MSTN 的 mRNA 表达量和蛋白质表达水平。**结果** 测序鉴定表明 pSIREN-MSTN-shRNA 表达载体构建成功,3 个重组质粒均能够明显降低肌肉组织中 MSTN 的 mRNA 和蛋白质水平,其中 pSIREN-M819 表达载体干扰效果最好,与对照组比较,MSTN 的 mRNA 表达量降低了 71%,蛋白水平也明显降低。**结论** 成功构建了 pSIREN-MSTN-shRNA 表达载体,并在小鼠体内能够有效抑制 MSTN 基因的表达。

关键词 抑肌素 RNA 干扰 实时荧光定量 PCR 免疫印迹

中图分类号 R746

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2020.05.037

作者单位:030006 太原,山西大学生物技术研究所、教育部化学生物学与分子工程重点实验室

通讯作者:钮利喜,电子信箱:nlx@sxu.edu.cn

Construction and Identification of shRNA Expression Vector Targeting MSTN Gene. Wang Lijun, Niu Lixi. Institute of Biotechnology, Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education, Shanxi University, Shanxi 030006, China

Abstract Objective To construct a short hairpin RNA (shRNA) eukaryotic expression vector targeting the MSTN gene and to identify its inhibitory effect in mice. **Methods** The siRNA was designed based on the mRNA sequence of MSTN gene (NM_010834.3). Three siRNAs which may have good interference effect were selected and shRNA was designed and synthesized, and the pSIREN - MSTN - shRNA expression vector was constructed. The vector was delivered to mice by intramuscular injection, and the mRNA expression and protein expression levels of MSTN in the muscle tissue of the mice were detected by real-time fluorescent quantitative PCR (qRT-PCR) and Western blotting (WB). **Results** The sequencing analysis showed that the pSIREN - MSTN - shRNA expression vector was successfully constructed. Three recombinant plasmids could significantly reduce the mRNA and protein levels of MSTN in muscle tissue. The pSIREN - M819 expression vector had the best interference effect. Compared with the control group, MSTN mRNA expression decreased by 71%, and the protein level also decreased significantly. **Conclusion** The pSIREN - MSTN - shRNA expression vector was successfully constructed and can effectively inhibit the expression of MSTN gene in mice.

Key words MSTN; RNA interference; qRT-PCR; Western blot

肌肉生长抑制素(myostatin, MSTN),简称抑肌素,又名生长分化因子8(GDF-8),是TGF- β 超家族成员之一,其功能主要是作为一种骨骼肌生长的负调控因子,限制肌肉超常发育^[1]。该基因的缺失或突变会使肌细胞增生和肥大,机体表现为双肌性状^[2,3]。对MSTN基因的深入研究在畜牧业及医学领域具有重要意义。近年来,研究发现MSTN不仅可调控肌肉生长发育,在肌肉稳态中起关键作用,而且还影响脂肪形成和骨骼发育,并与胰岛素敏感度有关^[4-6]。因此,有关MSTN基因与多种疾病的关系及其在机体代谢中的作用受到广泛关注。RNA干扰(RNA interference, RNAi)是指在进化过程中高度保守的、由双链RNA(double-stranded RNA, dsRNA)诱发的、同源mRNA高效特异性降解的现象^[7]。该技术可以简便、快速、高效、特异性地抑制基因的表达,因此受到了各个领域研究者的重视。该技术主要应用于探查基因功能、基因和转录调控研究等领域。本研究旨在构建具有良好干扰效果的pSIREN - MSTN - shRNA表达载体,为后续通过RNA干扰技术调控MSTN基因表达以改善和治疗MSTN相关疾病奠定基础。

材料与方法

1. 主要试剂和实验材料:限制性核酸内切酶BamH I和EcoR I(1010S和1040S,日本TaKaRa公司);T4 DNA连接酶(2011A,日本TaKaRa公司);质粒小量提取试剂盒(D1100,北京索莱宝科技有限公司);SYBR® Premix Ex Taq™ II(Tli RNaseH Plus)试剂盒(RR820A,日本TaKaRa公司);GDF-8抗体(sc-134345,美国Santa Cruz公司);GAPDH抗体

(MB001,南京巴傲得生物科技有限公司);m-IgGk BP-HRP二抗(sc-516102,美国Santa Cruz公司);琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒(D2500-01,美国Omega Bio-Tek公司);通用RT-PCR试剂盒(M-MLV)(RP1100,北京索莱宝科技有限公司);RIPA组织/细胞裂解液(R0020,北京索莱宝科技有限公司);shRNA序列合成、引物序列合成(深圳华大基因公司)。健康ICR小鼠购自山西医科大学动物实验中心,雄性,6~8周龄,20只。

2. MSTN shRNA序列的设计与合成:根据Genbank上已公布的小鼠MSTN基因的mRNA序列(NM_010834.3),选用Invitrogen的BLOCK-iT™ RNAi Designer软件,在线设计siRNA序列并挑选出3条可能具有良好干扰效果的siRNA序列,设计成包含正义链、loop环、反义链、转录终止信号和酶切位点的shRNA寡核苷酸单链^[8]。其序列详见表1。

3. pSIREN - MSTN - shRNA表达载体的构建:将设计合成的shRNA引物进行退火形成双链,同时使用限制性内切酶BamH I和EcoR I对载体pSIREN - DNR - DsRed - Express进行双酶切,1%琼脂糖凝胶电泳鉴定并用胶回收试剂盒回收酶切产物,与退火产物相连接(T4 DNA连接酶,16℃水浴过夜)。连接产物转化至E. coli DH5 α 感受态细胞,涂布于含有氨苄青霉素(100 μ g/ml)的固体LB平板上,37℃恒温培养。挑取阳性单菌落于5ml含有氨苄青霉素的液体LB培养基中培养10~12h,提取质粒,送至上海生工生物工程有限公司进行测序,鉴定重组质粒。将构建好的质粒命名为pSIREN - M664、pSIREN - M791和pSIREN - M819。

表 1 设计合成的 shRNA 序列

编号		序列方向(5'→3')	位点
MSTN - 664	上游引物	GATCCCCCATGAAAGACGGTACAATAGTGCTCCTGGTTGTTGTACCGTCTTTCATGGGTTTTTTG	664
	下游引物	AATTCAAAAAACCCATGAAAGACGGTACAACAACCAGGAGCACTATTGTACCGTCTTTCATGGGG	664
MSTN - 791	上游引物	GATCCCCCAACTTAGGCATTGAAATTAGTGCTCCTGGTTGATTTCATGCCTAAGTTGGTTTTTTG	791
	下游引物	AATTCAAAAAACCAACTTAGGCATTGAAATCAACCAGGAGCACTAATTTCATGCCTAAGTTGGG	791
MSTN - 819	上游引物	GATCCGGATGAGAATGGCCATGATTAGTGCTCCTGGTTGATCATGGCCATTCTCATCCTTTTTTG	819
	下游引物	AATTCAAAAAAGGATGAGAATGGCCATGATCAACCAGGAGCACTAATCATGGCCATTCTCATCCG	819

4. shRNA 表达载体导入小鼠体内:将 6~8 周龄的小鼠随机分为 4 组:pSIREN - M664 实验组、pSIREN - M791 实验组和 pSIREN - M819 实验组及阴性对照组(NC 组)。采用肌肉注射的方法将重组质粒载体导入小鼠体内。取 100μg 去内毒素质粒载体稀释于 200μl 的 PBS (pH 7.4) 溶液中,吸入 1ml 注射器,并将稀释液注入小鼠右后腿肌肉^[9,10]。注射 3 天后,采用断颈法处死小鼠,取其右后腿部肌肉组织,用于下一步实验。

5. qRT - PCR 检测干扰后 MSTN 的 mRNA 表达水平:取各组小鼠肌肉组织,通过 Trizol 法提取总 RNA,按照通用 RT - PCR 试剂盒说明书,将 RNA 反转录合成 cDNA,利用 SYBR 法的 real - time PCR 试剂盒,以 GAPDH 为内参基因,进行实时定量 PCR 反应。用于定量检测的 MSTN 引物序列和 GAPDH 的引物序列如下:MSTN - 上游引物为 AACCTTCCAGGACCAGGAGAA;MSTN - 下游引物为 GGCTTCAAAATCGACCGTGAGG;GAPDH - 上游引物为 ATCACTGCCACCCAGAAGACTG;GAPDH - 下游引物为 ATGCCAGTGAGCTTCCCCTTCAG。qRT - PCR 反应体系为 25μl;SYBR Premix Ex Taq II (2×)12.5μl、上下游引物(10μmol/L)各 1μl、模板 cDNA 2μl、ddH₂O 8.5μl。每份样品重复 3 次,结果采用 2^{-ΔΔCt}法进行数据处理。

6. Western blot 法检测干扰后 MSTN 的蛋白质表达:各组取一定量的小鼠肌肉组织,充分剪碎后置于 1.5ml 的无菌 EP 管中,按照每 20mg 组织加入 150~250μl 裂解液的比例加入 RIPA 组织/细胞裂解液,混合均匀,冰浴 30min 后,12000r/min、4℃ 离心 30min,上清液即为所提取的总蛋白。调节上样量至每孔 60μg 蛋白样品进行 12% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。将蛋白转印至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉室温封闭 1h,加入 GDF - 8 一抗工作液(1:200 稀释)和 GAPDH 一抗工作液(1:10000 稀释)孵育,4℃ 过夜。TBST 漂洗 3 次,加入 HRP 标记的二抗工作液(1:

1000 稀释)后 37℃ 孵育 1h。TBST 漂洗 3 次,ECL 显色。

7. 统计学方法:运用 Excel 进行数据预处理。采用 SPSS 19.0 统计学软件进行单因素方差分析,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. pSIREN - DNR - DsRed - Express 载体的酶切:对载体 pSIREN - DNR - DsRed - Express 进行 BamH I 和 EcoR I 双酶切,酶切后的质粒载体条带大小正确(图 1)。

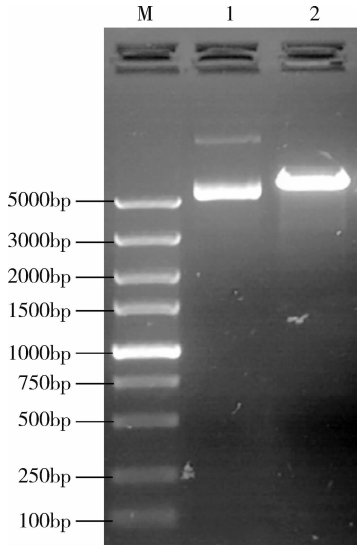


图 1 pSIREN - DNR - DsRed - Express 载体的酶切结果
M. DL5000 DNA Marker;1. 未经酶切的载体;2. 经过酶切的载体

2. pSIREN - MSTN - shRNA 表达载体的鉴定:由于插入的 shRNA 片段较小,不能通过 PCR 法或酶切鉴定,因此,将构建好的重组质粒送往上海生工生物公司测序鉴定,测试报告中的插入序列与所设计的 shRNA 引物序列完全一致,表明 pSIREN - MSTN - shRNA 表达载体构建成功,可以用于后续的干扰实验。测序结果详见图 2。

3. shRNA 干扰后 MSTN 的 mRNA 表达水平检测:利用 qRT - PCR 法检测干扰后小鼠肌肉组织中的

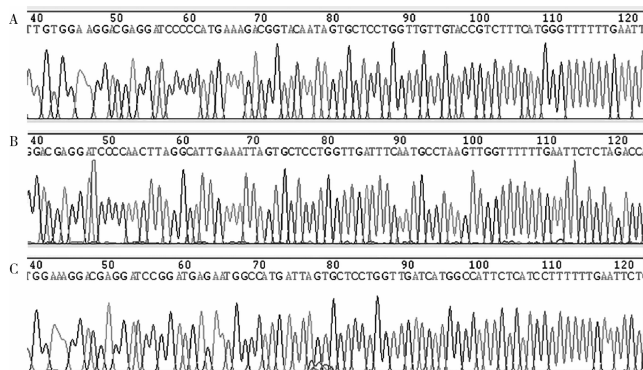


图2 pSIREN-MSTN-shRNA 表达载体测序结果

A. 重组质粒 pSIREN-MSTN-664; B. 重组质粒 pSIREN-MSTN-791; C. 重组质粒 pSIREN-MSTN-819

MSTN mRNA 表达水平,其检测结果详见图3。从条形图中可以看出3个干扰RNA实验组 MSTN mRNA 表达都有所降低,pSIREN-NC 组与其他各组 MSTN mRNA 表达水平差异有统计学意义($P < 0.01$)。干扰质粒组 pSIR-M664、pSIR-M791 和 pSIR-M819 与对照组中 MSTN 基因 mRNA 相对表达量比较,分别降低 65%、61% 和 71%。

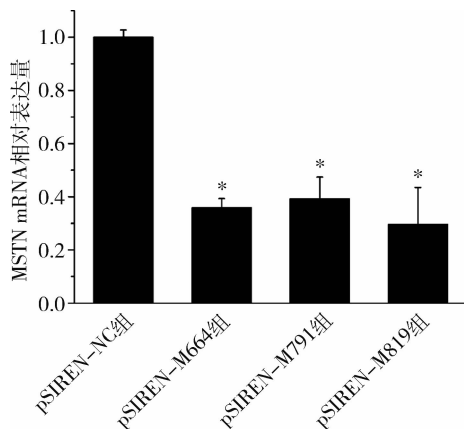


图3 MSTN 的 mRNA 表达水平检测

与 pSIREN-NC 组比较,* $P < 0.01$

4. 免疫印迹分析 (Western blot, WB): WB 法检测干扰后的 MSTN 蛋白表达水平,结果详见图4。3个 MSTN shRNA 实验组较对照组的 MSTN 蛋白表达量有一定程度的减少,表明 pSIR-M664、pSIR-M791 和 pSIR-M819 均能降低 MSTN 蛋白的表达。

讨 论

小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 是能够引起 RNA 干扰的小片段双链 RNA 分子。siRNA 可以整合到 RNA 诱导的沉默复合物 (RISC) 中,随后双链被分开,其中一条链在 RISC 作用下特异性与靶

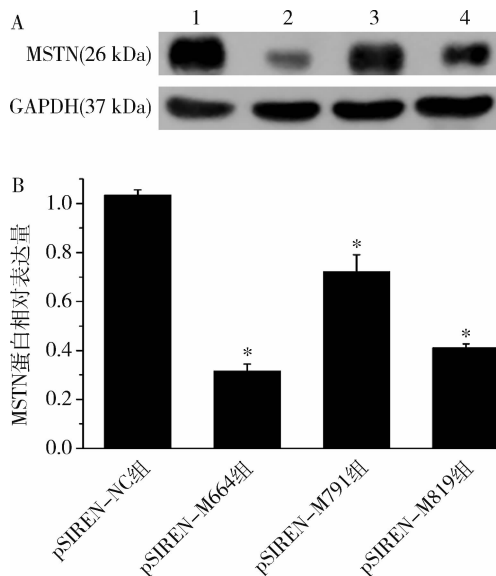


图4 MSTN 的蛋白表达水平检测

A. Western blot 法:1 为 shRNA 阴性对照组,2~4 分别为 pSIREN-M664、pSIREN-M791 和 pSIREN-M819 shRNA 表达载体干扰组;B. 灰度分析 MSTN 蛋白质相对表达量;与 pSIREN-NC 组比较,* $P < 0.01$

mRNA 识别结合,通过降解 mRNA 来阻断靶基因的表达^[11]。siRNA 阻断基因的表达具有高效性、特异性、操作简单等优点^[12]。但 siRNA 的半衰期短,而 shRNA 可以克服这一缺点,能够持续性地干涉靶基因^[13]。因此,与直接合成 siRNA 比较,利用 shRNA 表达载体表达来研究基因沉默要更为有效。对于 RNA 干扰载体,目前已经开发了许多病毒和非病毒载体,但病毒载体的安全性问题仍然存在。与使用病毒载体的方法比较,使用质粒 DNA 的基于非病毒载体的方法可能为诱导 RNAi 的更安全的方法^[14]。因此,本研究选用 pSIREN-DNR-DsRed-Express 质粒构建 shRNA 表达载体,以期得到具有显著干扰效果的 shRNA 分子,为后续通过 RNA 干扰技术调控 MSTN 基因表达来改善和治疗 MSTN 相关疾病奠定基础。

MSTN 是可以调控肌肉生长和发育的重要功能基因,其基因序列,尤其是外显子序列,在不同物种间高度同源,十分保守。MSTN 主要在骨骼肌中表达,在心肌、脂肪组织、淋巴组织、肺部、脾脏和小肠等其他组织或器官中也有不同程度的表达^[15]。随着不断深入的研究,发现 MSTN 基因除了可以负调控肌肉生长外,在脂代谢、糖代谢、骨形成和骨吸收中也起着重要的调节作用,具有广阔的应用前景和商业价值。MSTN 基因的敲减或敲除有助于提高家畜家禽胴体

的瘦肉率,从而提高饲料利用率、降低饲养成本,促进家畜家禽的肌肉生长和肉类生产^[16]。近年来,对家畜家禽 MSTN 基因做了大量研究,已有文献报道了牛、山羊、绵羊、猪、鸡、鸭的 shRNA 真核表达载体和慢病毒载体或腺病毒载体,但其大多是在细胞水平中验证载体干扰效果^[17~20]。在医学研究中 MSTN 基因已被确立为治疗肌肉萎缩、肌营养不良等肌变性疾病的一个新的靶标分子。通过抑制 MSTN 的表达来改善肌肉萎缩。此外,深入探讨 MSTN 基因对人类糖尿病、肥胖症、骨质疏松症及其他慢性疾病甚至癌症恶病质的治疗具有重要意义。MSTN 基因的 siRNA、miRNA、MSTN 抗体、MSTN 抑制剂等药物方面的研究,在临床医学上体现出很高的应用价值。

综上所述,本研究运用 qRT-PCR 和 WB 法分别从 mRNA 水平和蛋白质水平来验证所设计和构建的 pSIREN-MSTN-shRNA 表达载体在小鼠体内的干扰效果,为下一步建立动物模型研究 MSTN 的 siRNA 质粒治疗效果奠定工作基础。

参考文献

- McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member[J]. *Nature*, 1997, 387(6628): 83
- Grobet L, Martin LJR, Poncelet D, *et al.* A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle[J]. *Nat Genet*, 1997, 17(1): 71
- McPherron AC, Lee SJ. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 12457-12461
- Butcher JT, Mintz JD, Larion S, *et al.* Increased muscle mass protects against hypertension and renal injury in obesity[J]. *J Am Heart Assoc*, 2018, 7(16): e009358
- Chen YS, Guo Q, Guo LJ, *et al.* GDF 8 inhibits bone formation and promotes bone resorption in mice[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2017, 44(4): 500-508
- Rodgers BD. Does myostatin induce insulin resistance? [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(30): 21203
- 郭彬. RNA 干扰 MSTN 和 SS 转基因小鼠的生长与繁殖性能及健康状况评价[D]. 武汉:华中农业大学, 2015
- Safari F, Barouji SR, Tamaddon AM. Strategies for improving siRNA-induced gene silencing efficiency[J]. *Adv Pharm Bull*, 2017, 7(4): 603
- 方艳秋, 魏海峰, 李丹, 等. CEA 迷你基因串联疫苗免疫小鼠脾细胞对 CEA 阳性肿瘤细胞的杀伤作用及疫苗的安全性评价[J]. *中国免疫学杂志*, 2017, 33(2): 217-219, 225
- 张亮, 李潇潇, 韩刚, 等. 不同方式递送质粒 DNA 诱导体内表达效果的实验研究[J]. *军医进修学院学报*, 2010, 31(1): 48-49, 60
- Karim M, Tha K, Othman I, *et al.* Therapeutic potency of nanofomulations of siRNAs and shRNAs in animal models of cancers[J]. *Pharmaceutics*, 2018, 10(2): 65
- Lee YK, Kim KS, Kim JS, *et al.* Leukemia-specific siRNA delivery by immunonanoplexes consisting of anti-JL1 minibody conjugated to oligo-9 Arg-peptides[J]. *Mol Cells*, 2010, 29(5): 457-462
- Deng Y, Wang CC, Choy KW, *et al.* Therapeutic potentials of gene silencing by RNA interference: principles, challenges, and new strategies[J]. *Gene*, 2014, 538(2): 217-227
- Takahashi Y, Nishikawa M, Takakura Y. Nonviral vector-mediated RNA interference: its gene silencing characteristics and important factors to achieve RNAi-based gene therapy[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61(9): 760-766
- Fan X, Gaur U, Sun L, *et al.* The growth differentiation factor 11 (GDF11) and myostatin (MSTN) in tissue specific aging[J]. *Mech Ageing Dev*, 2017, 164: 108-112
- Hu S, Ni W, Sai W, *et al.* Knockdown of myostatin expression by RNAi enhances muscle growth in transgenic sheep[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e58521
- Tessanne K, Golding MC, Long CR, *et al.* Production of transgenic calves expressing an shRNA targeting myostatin [J]. *Mol Reprod Dev*, 2012, 79(3): 176-185
- Kumar R, Singh SP, Mitra A. Short-hairpin mediated myostatin knockdown resulted in altered expression of myogenic regulatory factors with enhanced myoblast proliferation in fetal myoblast cells of goats[J]. *Anim Biotechnol*, 2018, 29(1): 59-67
- Hati Boruah JL, Ranjan R, Gogoi H, *et al.* Effect of co-transfection of anti-myostatin shRNA constructs in caprine fetal fibroblast cells [J]. *Anim Biotechnol*, 2016, 27(1): 44-51
- 王红娜, 孙洪新, 张英杰, 等. 腺病毒介导 shRNA 干扰绵羊 MSTN 基因效果及对生肌调节因子和干扰素反应基因表达的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 2017, 48(10): 1833-1842
- (收稿日期:2019-10-25)
- (修回日期:2019-11-12)
- Rasmussen SB, Saied NN, Bowens C, *et al.* Duration of upper and lower extremity peripheral nerve blockade is prolonged with dexamethasone when added to ropivacaine: a retrospective database analysis[J]. *Pain Med*, 2013, 14(8): 1239-1247
- Tandoc MN, Fan L, Kolesnikov S, *et al.* Adjuvant dexamethasone with bupivacaine prolongs the duration of interscalene block: a prospective randomized trial[J]. *J Anesth*, 2011, 25(5): 704-709
- Kim YJ, Lee GY, *et al.* Dexamethasone added to levobupivacaine improves postoperative analgesia in ultrasound guided interscalene brachial plexus blockade for arthroscopic shoulder surgery[J]. *Korean J Anesthesiol*, 2012, 62(2): 130
- Choi S, Rodseth R, McCartney CJL. Effects of dexamethasone as a local anaesthetic adjuvant for brachial plexus block: a systematic review and Meta-analysis of randomized trials[J]. *Br J Anaesth*, 2014, 112(3): 427-439
- Knezevic NN, Anantamongkol U, Candido KD. Perineural dexamethasone added to local anesthesia for brachial plexus block improves pain but delays block onset and motor blockade recovery[J]. *Pain Physician*, 2015, 18(1): 1-14
- Gildasio S De Oliveira, Almeida MD, Benzon HT, *et al.* Perioperative single dose systemic dexamethasone for postoperative pain: a Meta-analysis of randomized controlled trials[J]. *Anesthesiology*, 2011, 115(3): 575-588
- 张大志, 王怀江, 刘永盛, 等. 不同剂量地塞米松对罗哌卡因神经阻滞作用的影响[J]. *临床麻醉学杂志*, 2013, 29(3): 213-215
- (收稿日期:2019-10-31)
- (修回日期:2019-11-24)

(上接第 159 页)