

核糖体蛋白 S6 shRNA 慢病毒载体的构建及其对肺腺癌 A549 细胞株增殖的影响*

陈勃江, 李为民[△], 刘丹, 张雯

四川大学华西医院 呼吸内科(成都 610041)

【摘要】 目的 探讨靶向抑制核糖体蛋白 S6(rpS6)表达的短发夹 RNA(short hairpin RNA, shRNA)慢病毒载体的构建方法及抑制 rpS6 表达对肺腺癌 A549 细胞株增殖的影响。**方法** 合成针对 rpS6 基因的双链寡核苷酸序列,插入质粒载体 pGCsil-GFP,转化大肠杆菌细胞,测序鉴定插入片段;再通过 293T 细胞转染和慢病毒包装,收集浓缩病毒并感染肺腺癌 A549 细胞株。流式细胞技术分选强阳性表达绿色荧光蛋白(GFP)的细胞克隆,荧光定量 PCR 及 Western blot 检测 rpS6 基因的 mRNA 和蛋白干扰效率。体外利用 CCK-8 试剂盒定点检测细胞的光密度(OD)值,分析抑制 rpS6 表达对肺腺癌 A549 细胞株增殖能力的影响。**结果** 重组 pGCsil-sh-rpS6-GFP 质粒经测序鉴定示:插入序列与 rpS6 干扰序列完全符合,证实 pGCsil-sh-rpS6-GFP 质粒构建成功。sh-rpS6 慢病毒稳定感染 A549 细胞株后,流式细胞技术分选 GFP 强阳性表达的细胞克隆比率为 86.80%。荧光定量 PCR 与 Western blot 检测示:sh-rpS6 组的 mRNA 和蛋白干扰效率分别为(79.72±6.83)%、(83.77±12.13)%。体外增殖实验示:与 A549 细胞相比,sh-rpS6 组在各时间点的 OD 值较对照组均下降(均 $P<0.05$)。**结论** 构建的 sh-rpS6 慢病毒载体能稳定、有效地抑制肺腺癌 A549 细胞株 rpS6 的表达,并有效减慢 A549 细胞株的增殖速度。

【关键词】 核糖体蛋白 S6 短发夹 RNA 肺腺癌 增殖

Construction of sh-rpS6 Lentivirus Vectors and Its Effect on Proliferation in Lung Adenocarcinoma A549 Cell Lines

CHEN Bo-jiang, LI Wei-min[△], LIU Dan, ZHANG Wen. Department of Respiratory Medicine, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

[△] Corresponding author, E-mail: weimi003@yahoo.com

【Abstract】 Objective To construct the sh-rpS6 lentivirus vector targeting ribosomal protein S6 (rpS6) and explore its effect on proliferation in lung adenocarcinoma A549 cell lines. **Methods** Sequences targeting the rpS6 gene were selected. The double strand shRNA oligo was ligated to pGCsil-GFP lentivirus vector and transformed into *E. coli*. The resulting recombinant vector was verified by sequencing. After transfection and lentivirus packing, the viral particles were collected and infected A549 cells. After selection of GFP positive cells by FACS, mRNA and protein expression levels of rpS6 were determined by real time PCR and Western blot. In the following experiment, the proliferation changes of A549 cell lines after the interference by sh-rpS6 was investigated by using CCK-8 kit. **Results** The sequencing result confirmed that pGCsil-sh-rpS6-GFP vector was successfully developed. Stably transfected A549 cell lines by sh-rpS6 were selected through FACS, with a selection ratio of 86.80%. The silencing effects of sh-rpS6 were determined by real time PCR and Western blot, suggesting that mRNA and protein expression of rpS6 in the targeted cells reduced by (79.72±6.83)% and (83.77±12.13)%, significantly lower than those of control groups. *In vitro* showed the cell proliferation with sh-rpS6 was significantly slower than that of controls ($P<0.05$). **Conclusion** The constructed sh-rpS6 lentivirus vector could inhibit the expression of rpS6 in A549 cell lines effectively and significantly slow the cell proliferation *in vitro*.

【Key words】 Ribosomal protein S6 (rpS6) Short hairpin RNA (shRNA) Lung adenocarcinoma Proliferation

肺癌是全球范围内导致肿瘤相关死亡的首位恶性肿瘤^[1]。近年来,大量研究聚焦于各种癌基因的异常激活及其相关信号传导通路,为肺癌的防治开

辟了新途径。蛋白质合成是基因表达的根本,主要在核糖体内完成。核糖体蛋白 S6 (ribosomal protein S6, rpS6)是核糖体结构蛋白,有研究报道, rpS6 参与正常细胞大小的调节,其磷酸化是细胞生长与存活的关键环节^[2,3]。在食管癌^[4]、口腔癌^[5]、胰腺癌^[6]等多种恶性肿瘤中检测到 rpS6 的异常高表达;而其在肺癌中的作用鲜见报道。

* 国家自然科学基金(No. 81241068, No. 81372504)、中国博士后科学基金(2013M542281)、四川省科技厅应用基础研究(No. 2013JY0012)资助

[△] 通讯作者, E-mail: weimi003@yahoo.com

由于超过 85% 的肺癌为非小细胞肺癌(NSCLC),且腺癌的发病率逐年升高,故本研究以肺腺癌 A549 细胞株为目的细胞株,利用 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)技术,合成针对 *rpS6* 的短发夹 RNA(short hairpin RNA, shRNA)序列,以慢病毒为载体,将其转染到 A549 细胞中,特异性抑制 *rpS6* 的表达;采用免疫荧光定量 PCR(Real-time PCR)和 Western Blot 检测 *rpS6* 的抑制效率,并获得稳定抑制的细胞克隆;再在体外采用 CCK-8 试剂盒检测抑制 *rpS6* 表达对 A549 细胞增殖速度的影响。

1 材料与与方法

1.1 材料

质粒 pGCsil-GFP(带绿色荧光)、辅助质粒 pHelper 1.0、pHelper 2.0 及 293T 细胞、PCR 用试剂 primer(R&F)均购自上海吉凯基因技术有限公司;胎牛血清购自上海微科生化试剂有限公司;凯基全蛋白抽提试剂盒购于南京凯基生物科技公司;A549 细胞株、DMEM 细胞培养基、Age I 和 EcoR I、兔抗人 S6 抗体(1:1 000, #2217)、Phototope - HRP Western blot 二抗及 Cell Counting kit-8 (CCK-8)分别为美国 ATCC、GIBCO、New England Biolabs、Cell signaling technology、NEB、日本 Dojindo 产品。

1.2 方法

1.2.1 靶向干扰 *rpS6* 表达的 pGCsil-sh-*rpS6*-GFP 质粒的构建 在 NCBI 基因库中查找 *rpS6* 的基因 mRNA 序列(NM_001010, 829 bp),根据 RNAi 序列的设计原则,采用 Beacon designer 2 软件设计并合成特异性沉默 *rpS6* 的双链寡核苷酸(double-strand oligonucleotide, ds oligo)。*rpS6* 的 shRNA 序列为 TGAACGCAAACCTTCGTACT,同时设计阴性对照(NC)序列。经退火形成带粘性末端的双链。Age I 和 EcoR I 酶切 pGCsil-GFP 载体,使其线性化并与 ds oligo 连接,再转化大肠杆菌细胞,提取阳性克隆,PCR 送 Invitrogen 公司测序鉴定插入序列片段。

PCR 上游引物:5'-CCTATTTCCCATGATTCCTTCATA-3';PCR 下游引物:5'-GTAATACGGT TATCCACGCG-3'。PCR 电泳以 ddH₂O 作为对照以排除外源性核酸污染所导致的假阳性。

1.2.2 慢病毒的包装、收获与滴度测定 将 pGCsil-sh-*rpS6*-GFP 质粒和辅助质粒 pHelper

1.0、pHelper 2.0 按照 Qiagen 试剂盒操作说明进行高纯度无内毒素抽提。将 293T 细胞铺板并保证细胞处于良好状态,加入 Lipofectamine 2000 试剂与各质粒 DNA 混合液进行细胞转染。置于 37 °C、5%CO₂ 孵箱孵育 48 h 后收集 293T 细胞上清液,置于 4 °C、4 000 ×g 离心 10 min 获得浓缩病毒液。设置 8 孔,将病毒原液按照 10 倍比例梯度稀释,采用“逐孔稀释法”测定病毒滴度。设病毒原液的病毒滴度为 x TU/μL,则第 2 至第 8 管病毒滴度为 x × 10⁻¹ TU/μL ~ x × 10⁻⁷ TU/μL。各管分别取 10 μL 加入各孔 293T 细胞中,则第 1 孔至第 8 孔的病毒总量为 x × 10 TU ~ x × 10⁻⁶ TU,病毒原液量为 10 μL ~ 10⁻⁶ μL。观察细胞孔中可清晰计数的带荧光的细胞数(每个带荧光的细胞均感染了 1 个病毒),即为该孔中感染了细胞的病毒总量,根据公式“病毒滴度(TU/μL) = 带有荧光细胞数/病毒原液量”计算病毒滴度^[7]。

1.2.3 感染目的细胞 A549 细胞株及流式细胞技术筛选 所有实验均分为 3 组:sh-*rpS6* A549 细胞组(sh-*rpS6* 组)、阴性对照病毒 A549 细胞组(NC 组)和未干预的 A549 细胞组(A549 组)。通过前期预实验确定 A549 细胞株的感染最佳条件:感染复数(multiplicity of infection, MOI)值 = 40,且同时予完全培养基及 5 μg/mL polybrene 孵育细胞。按 5 × 10⁴/孔将 A549 细胞接种于 6 孔板,当细胞融合度达到 30% 左右时,相当于细胞数为 1 × 10⁵/孔,所需病毒量为细胞数的 40 倍,即 4 × 10⁶ TU/孔;再结合病毒滴度计算每孔需加入的病毒体积和 polybrene 进行病毒感染细胞实验。24 h 后以含 10% 胎牛血清的完全培养基为细胞换液,继续孵育,并每 24 h 于荧光显微镜下观察报告基因 GFP 的表达情况。当荧光率大于 80% 时,提示感染达到理想状态。加胰酶消化细胞并采用无菌流式细胞术筛选强阳性表达绿色荧光蛋白的稳定感染 sh-*rpS6* 慢病毒载体的 A549 细胞,获得纯化细胞。再将纯化的细胞接种至培养皿,加含有 10% 胎牛血清的培养基,置于 5%CO₂、37 °C 孵箱继续培育,取部分纯化细胞分为 2 份,分别提取 RNA 和总蛋白。

1.2.4 荧光定量 PCR 鉴定 *rpS6* mRNA 的干扰效率 按照 RNase-free 操作提取 3 组细胞(sh-*rpS6* 组、NC 组及 A549 组)总 RNA,再根据 Promega 公司 M-MLV 操作说明书进行 RNA 逆转录获得 cDNA。以 β-actin 为内参,采用两步法荧光定量 PCR 测定 mRNA,2^{-ΔΔCt} 计算 mRNA 表达量,再根

据公式“(对照组 mRNA 值 - 干扰组 mRNA 值)/对照组 mRNA 值 $\times 100\%$ ”计算 sh-*rpS6* 组 mRNA 干扰效率。引物利用 Beacon designer 2 软件设计, *rpS6* 上游引物: 5'-ATTCAGCGTCTTGTTACTC CAC-3', 下游引物: 5'-CCTTAGCCTCCTTCATT CTCTTG-3'。

1.2.5 Western blot 检测 *rpS6* 的蛋白干扰效率

使用凯基全蛋白提取试剂盒, 按照说明书步骤, 分别提取 3 组细胞的总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。SDS-PAGE 电泳, 转膜、封闭后滴加抗 *rpS6* 一抗 (1:1 000 稀释) 于膜上并 4 °C 孵育过夜; 洗涤后再滴加二抗, 孵育 60 min; 显色液显色, Quantity one 软件检测蛋白条带, 以目的蛋白与 β -actin 内参的积分光密度 (IOD) 比值表示蛋白相对含量。sh-*rpS6* 组蛋白干扰效率计算公式为: (对照组 IOD 值 - 干扰组 IOD 值)/对照组 IOD 值 $\times 100\%$ 。

1.2.6 CCK-8 法检测体外细胞增殖能力

实验分组: 除上述 3 组细胞组外, 同时设置培养基组 (无细胞), 共 4 组。将生长状态良好的目的细胞用完全培养基配制成细胞悬液, 以 2×10^3 /孔接种至 96 孔板, 每组 3 个复孔。各孔定容至 100 μ L, 孵箱培养 24 h。向各孔加入 10 μ L CCK-8 溶液, 注意避免产生气泡, 再置孵箱中孵育 1 ~ 2 h。利用酶标仪分别在加入 CCK-8 后 24 h、48 h、72 h、96 h、120 h 及 144 h 时间点测定细胞在 450 nm 处的光密度 (OD) 值, 绘制细胞生长曲线, 分析各组细胞的增殖能力。

1.2.7 统计学方法

计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。正态分布且方差齐性, 则多组间进行单因素方差分析 (ANOVA), 两两比较采用 LSD 法; 否则则作非参数秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 pGCsil-sh-*rpS6*-GFP 载体的构建及鉴定

PCR 电泳结果显示, 连接的空载体片段大小为 306 bp, sh-*rpS6* 阳性克隆片段大小为 343 bp (已从载体切去 24 bp), 提示阳性克隆片段已插入质粒中 (图 1)。

图 2 显示阳性克隆菌群的测序结果。可见 sh-*rpS6* 片段包含在阳性克隆序列中, 为: Ccg gaaTGAACGCAA ACTTCGTACTTTCAAGAGA AGTACGAAGTTTGCGTTCAttTTTTTg, 完全符合之前设计的 shRNA 片段序列, 说明 sh-*rpS6* 序列已成功克隆到慢病毒 pGCsil-sh-*rpS6*-GFP 载体中。

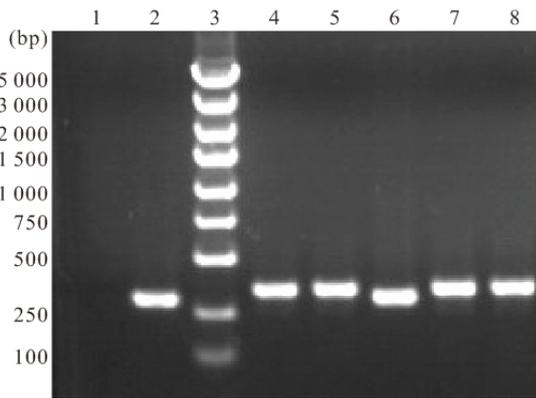


图 1 pGCsil-sh-*rpS6*-GFP 质粒的 PCR 电泳结果

Fig 1 PCR electrophoresis for pGCsil-sh-*rpS6*-GFP PCR positive clones

1: Control (ddH₂O); 2: Negative vector control (NC); 3: Marker; 4-8: pGCsil-sh-*rpS6*-GFP

2.2 慢病毒的包装、收获与滴度测定

由图 3 可见, 病毒转染 293T 细胞 4 d 后, 在第 8 孔 (图 3 H) 中观察到 3 个带荧光的细胞, 提示该孔有 3 个病毒感染细胞, 病毒总量为 3, 病毒滴度为 3×10^6 TU/ μ L, 即 3×10^9 TU/mL。

2.3 感染目的细胞 A549 细胞株及流式细胞技术分选阳性克隆

计算每孔细胞所需加入的病毒体积, 为 1.3 μ L [$(4 \times 10^6$ TU)/(3×10^9 TU/mL)]。加入病毒 5 d 后, sh-*rpS6* 和 NC 组 80% 细胞出现绿色荧光, A549 组未见荧光, 所有细胞均状态良好 (图 4)。

流式细胞技术分选阳性表达 GFP 蛋白的细胞, 分析显示 GFP 强阳性的细胞占细胞总数的 86.80%, 说明所构建的慢病毒载体为靶细胞有较高的感染效率。

2.4 *rpS6* mRNA 和蛋白干扰效率的检测结果

荧光定量 PCR 示: A549 组 (0.942 ± 0.034) 及 NC 组 (1.002 ± 0.080) 细胞相比, 差异无统计学意义, sh-*rpS6* 组的 *rpS6* mRNA 水平 (0.191 ± 0.008) 则较前二者降低 ($P < 0.05$), 提示 sh-*rpS6* 干扰 A549 细胞株中 *rpS6* mRNA 的表达。sh-*rpS6* 组的 mRNA 干扰效率为 (79.72 ± 6.83)%。

如图 5 所示, NC 组 (0.790 ± 0.145) 和未干预的 A549 细胞 (0.986 ± 0.121) 相比, 差异无统计学意义, sh-*rpS6* 组 *rpS6* 的蛋白表达 (0.160 ± 0.117) 则较前二者下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。说明 *rpS6* 蛋白在 A549 细胞中获得稳定沉默。sh-*rpS6* 细胞组的蛋白干扰效率为 (83.77 ± 12.13)%。

2.5 体外细胞增殖能力的影响

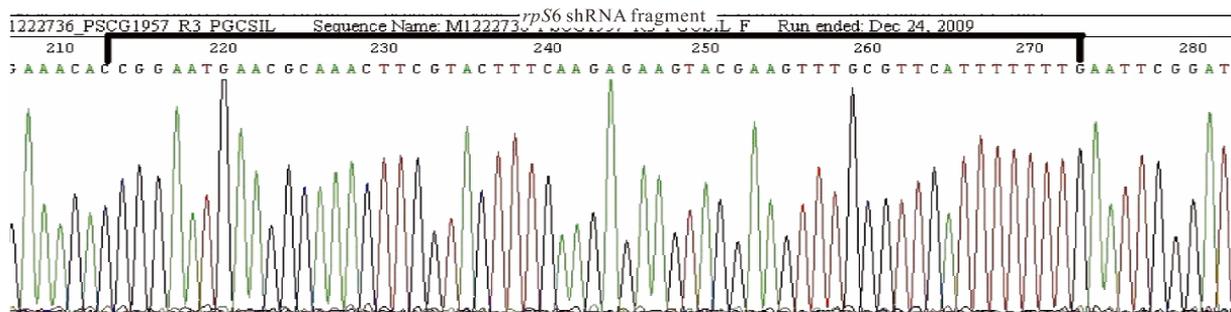


图 2 pGCsil-sh-rpS6-GFP 质粒测序结果

Fig 2 Sequencing results for pGCsil-sh-rpS6-GFP plasmid

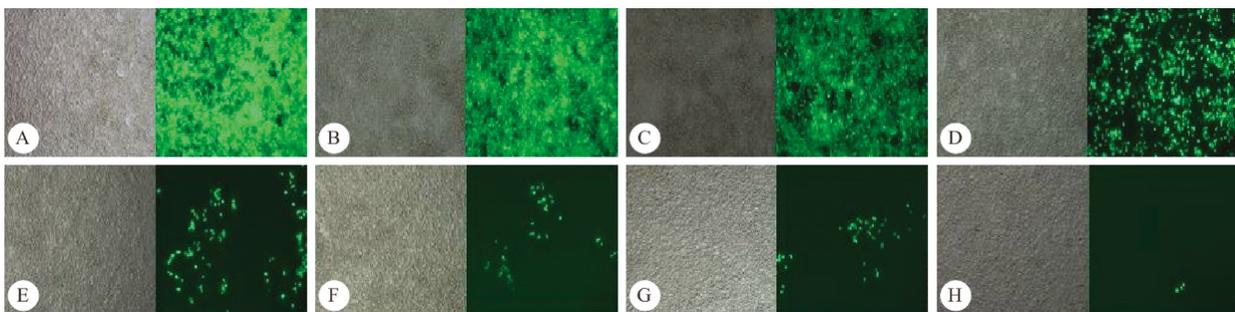


图 3 “逐孔稀释法”测定 sh-rpS6 慢病毒滴度。×100

Fig 3 Determination the titer for lentiviral sh-rpS6 with the method of hole-by-dilution in bright fields and fluorescent fields. ×100

A: Virus stock; B-H: Virus solutions with sequential 10-fold dilutions from the virus stock, indicating that their virus titers were 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} and 10^{-7} to virus stock respectively

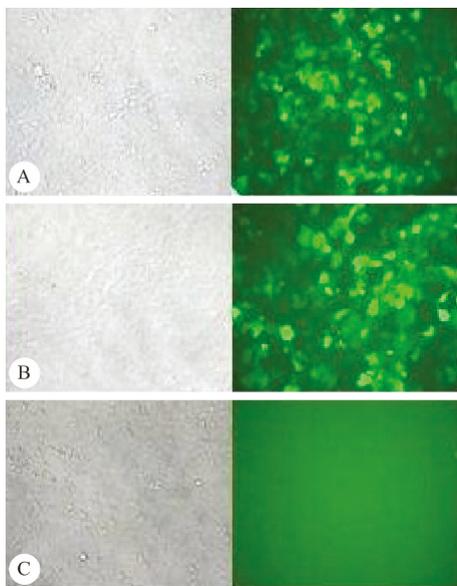


图 4 各组 A549 细胞株感染病毒 5 d 的荧光表达。×100

Fig 4 Expression of A549 cells infected with the lentiviral sh-rpS6 at 5 d in bright fields and fluorescent fields. ×100

A: sh-rpS6 group; B: NC group; C: A549 group

以时间点为横坐标、OD 值为纵坐标绘制细胞生长曲线, 见图 6。结果显示: NC 组与 A549 细胞组 OD 值差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 即慢病毒载体对细胞增殖能力无影响; sh-rpS6 组的细胞 OD

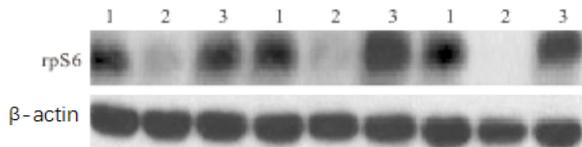


图 5 各组细胞 rpS6 的蛋白表达水平

Fig 5 Expression of rpS6 protein in all groups

1: NC group; 2: sh-rpS6 group; C: A549 group

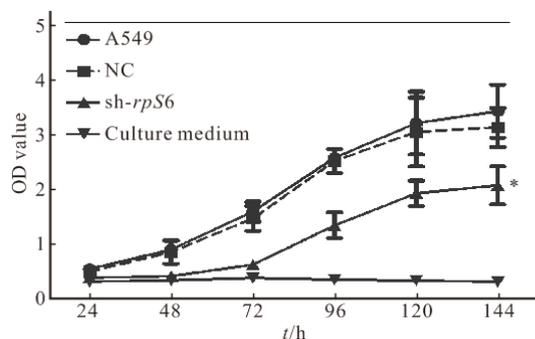


图 6 各组细胞在不同时间点的 OD 值

Fig 6 OD values of the cells in each group at each point

* $P < 0.05$, vs. NC group and A549 group

值较对照组下降 ($P < 0.05$), 干扰 rpS6 的基因表达显著抑制细胞的增殖速度。

3 讨论

RNAi 的基本原理是利用小干扰 RNA (small interference RNA, siRNA) 致目的基因降解,从而使靶基因沉默^[8]。RNAi 具有高效性、高特异性、高稳定性、可遗传性等特点,对靶基因的干扰效率主要由载体系统和细胞感染效率决定^[7,8]。常用的载体系统分为病毒载体和非病毒载体两大类。前者主要包括腺病毒、慢病毒,后者则指脂质体、质粒等^[7,8]。以非病毒载体为媒介的 RNAi 对不同靶细胞的感染效率有明显差异,但普遍存在感染率低的缺陷。病毒载体的最大优点是对目的细胞的感染效率高、对靶基因的干扰效率稳定。常用的病毒载体包括腺病毒和慢病毒。腺病毒载体感染起效快、效率高。但因腺病毒载体无法将外源基因整合到目的细胞的基因组中,故其介导的基因沉默时间短;同时,腺病毒的基因组较大,在转移外源性基因的同时,也会表达大量的病毒自身蛋白,激活宿主免疫系统,从而杀灭感染细胞,使干扰持续时间进一步降低^[7,8]。慢病毒载体转移的基因片段容量大,且免疫原性低,病毒遗传物质能与宿主基因整合,并随细胞分裂而传递,使靶片段在细胞多次分裂后的仍能稳定表达,从而实现目的基因的长效、稳定干扰,适用于体内、体外研究,目前已有大量相关报道^[7-10]。此外,提高 RNAi 效率的另一种办法是设计 shRNA。shRNA 包含 2 个短的反向重复序列,中间由一茎环(loop)序列分隔的,组成发夹结构,且以 5~6 个连续 T 作为 RNA 聚合酶 III 的转录终止子。将 siRNA 序列以“短发夹”的形式克隆进质粒载体中,当进入细胞后,该发夹序列被表达出来,形成一个“双链 RNA”,并被 RNAi 通道处理,使靶基因沉默。且与 siRNA 相比,shRNA 的作用更稳定、高效^[7,11]。

本研究选择慢病毒为 RNAi 载体,构建针对 rpS6 表达的 shRNA,感染 A549 细胞 5 d 后,细胞感染率即达 80%,且 rpS6 的 mRNA 和蛋白的抑制率亦达 80% 左右,与刘丹^[7]、Zavareh^[12] 及 Deharvengt 等^[13] 所报道的结果基本一致,显示出较高的干扰效率,为后续分析、比较细胞生物学行为的研究奠定了坚实基础。

rpS6 是核糖体 40S 小亚基的结构蛋白,在 Ser235/Ser236 位点磷酸化后活化,形成 p-rpS6 (phospho-rpS6),后者与含有 5' 末端寡嘧啶段(5' terminal oligopyrimidine tract, 5'-TOP) 结构的 mRNA (TOP mRNA) 结合,影响 TOP mRNA 与核

糖体的亲和力,从而调节 mRNA 翻译的起始,影响多种基因表达,调控细胞生长、增殖等活性^[14]。Akar 等^[15] 发现干扰乳腺癌细胞株 rpS6 上游激酶 p70S6K 的表达后 rpS6 的水平明显下降,细胞在体外的增殖速度下降 50%。将细胞注入裸鼠体内,肿瘤增殖降低。该实验显示 rpS6 有促乳腺癌细胞增殖的作用。Buck 等^[16] 下调胰腺癌细胞株中 p-rpS6 的水平,也发现细胞增殖速度显著减慢。本研究对肺腺癌 A549 细胞株的研究结果与 Akar 和 Buck 的研究结果一致,均提示 rpS6 有促进肿瘤细胞增殖的作用。

综上,本研究成功构建了可特异性抑制 rpS6 表达的 sh-rpS6 慢病毒载体;进一步体外实验发现:干扰 rpS6 基因能显著抑制 A549 细胞株的增殖能力。我们设想:在动物和人体内,可否通过沉默 rpS6 的表达而抑制肺癌细胞的增殖速度,从而实现减小肿瘤体积、减缓疾病进展之目标? rpS6 或许可以成为 NSCLC 治疗的潜在靶点。当然,这之中尚有诸多问题需要深入分析和探讨。

参 考 文 献

- 1 Chen B, Wang Y, Cao H, *et al.* Early lung cancer detection using the self-evaluation scoring questionnaire and chest digital radiography: a 3-year follow-up study in China. *J Digit Imaging*, 2013; 26(1): 72-81.
- 2 Rosner M, Schipany K, Hengstschlager M. Phosphorylation of nuclear and cytoplasmic pools of ribosomal protein S6 during cell cycle progression. *Amino Acids*, 2013; 44(4): 1233-1240.
- 3 Chen L, Hu L, Dong JY, *et al.* Rapamycin has paradoxical effects on S6 phosphorylation in rats with and without seizures. *Epilepsia*, 2012; 53(11): 2026-2033.
- 4 Kim SH, Jang YH, Chau GC, *et al.* Prognostic significance and function of phosphorylated ribosomal protein S6 in esophageal squamous cell carcinoma. *Mod Pathol*, 2013; 26(3): 327-335.
- 5 Chaisuparat R, Rojanawatsirivej S, Yodsanga S. Ribosomal protein S6 phosphorylation is associated with epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Pathol Oncol Res*, 2013; 19(2): 189-193.
- 6 Khalailieh A, Dreazen A, Kahtib A, *et al.* Phosphorylation of ribosomal protein S6 attenuates DNA damage and tumor suppression during development of pancreatic cancer. *Cancer Res*, 2013; 73(6): 1811-1820.
- 7 刘丹, 黄 蕊, 陈勃江等. 慢病毒载体介导人非小细胞肺癌 A549 细胞 Akt2 基因靶向抑制. *中华肺部疾病杂志(电子版)*, 2011; 4(6): 454-461.
- 8 孙 平, 赵 微, 赵毅玲. RNA 干扰技术的原理与应用. *医学综述*, 2011; 17(2): 164-167.

- 9 Cockrell AS, Kafri T. Gene delivery by lentivirus vectors. *Mol Bio technol*,2007;36(3):184-204.
- 10 Allen EH, Atkinson SD, Liao H, *et al.* Allele-specific siRNA silencing for the common keratin 12 founder mutation in Meesmann epithelial corneal dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*,2013;54(1):494-502.
- 11 Burnett JC, Rossi JJ, Tiemann K. Current progress of siRNA/shRNA therapeutics in clinical trials. *Biotechnol J*,2011;6(9):1130-1146.
- 12 Zavareh RB, Sukhai MA, Hurren R, *et al.* Suppression of cancer progression by MGAT1 shRNA knockdown. *PLoS One*,2012;7(9):e43721.
- 13 Deharvengt SJ, Tse D, Sideleva O, *et al.* PV1 down-regulation via shRNA inhibits the growth of pancreatic adenocarcinoma xenografts. *J Cell Mol Med*,2012;16(11):2690-2700.
- 14 Hellyer NJ, Nokleby JJ, Thicke BM, *et al.* Reduced ribosomal protein s6 phosphorylation after progressive resistance exercise in growing adolescent rats. *J Strength Cond Res*,2012;26(6):1657-1666.
- 15 Akar U, Ozpolat B, Mehta K, *et al.* Targeting p70S6K prevented lung metastasis in a breast cancer xenograft model. *Mol Cancer Ther*,2010;9(5):1180-1187.
- 16 Buck E, Eyzaguirre A, Haley JD, *et al.* Inactivation of Akt by the epidermal growth factor receptor inhibitor erlotinib is mediated by HER-3 in pancreatic and colorectal tumor cell lines and contributes to erlotinib sensitivity. *Mol Cancer Ther*,2006;5(8):2051-2059.

(2013-12-11 收稿,2014-01-08 修回)

编辑 吕 熙

(上接第 277 页)

HbA1c 的不足,但 GA 更容易受到应激状态后的高血糖的影响,此时 GA 和 HbA1c 联合测定有助于判断高血糖的持续时间,可作为既往是否患有糖尿病的辅助检测方法,从而作出客观准确的评估。

总之,GA 可作为单一方法诊断 DM,其最佳切点值为 16.6%,敏感性和特异性分别为 71.8% 和 87.4%,诊断价值中等。GA 可能不适合用于单独诊断 IGR。

参 考 文 献

- 1 Jia WP, Pang C, Chen L, *et al.* Epidemiological characteristics of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in a Chinese adult population: the Shanghai Diabetes Studies, a cross-sectional 3-year follow-up study in Shanghai urban communities. *Diabetologia*,2007;50(2):286-292.
- 2 Lee EY, Lee BW, Kim D, *et al.* Glycated albumin is a useful glycation index for monitoring fluctuating and poorly controlled type 2 diabetic patients. *Acta Diabetol*,2011;48(2):167-172.
- 3 Schaefer EJ, Audelin MC, McNamara JR. Comparison of fasting and postprandial plasma lipoproteins in subjects with and without coronary heart disease. *Am J Cardiol*,2001;88(10):1129-1133.
- 4 World Health Organization. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications: report of a WHO consultation. Part 1. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Geneva, World Health Org,1999.
- 5 American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*,2010;33(Suppl 1):S62-S69.
- 6 El-Agouza I, Abu Shahla A, Sirdah M. The effect of iron-deficiency anaemia on the glycosylated hemoglobin subtypes: possible consequences for clinical diagnosis. *Clin Lab Haematol*,2002;24(5):285-289.
- 7 Gómez-Pérez FJ, Valles-Sanchez VE, López-Alvarenga JC, *et al.* Vitamin E modifies neither fructosamine nor HbA1c levels in poorly controlled diabetes. *Rev Invest Clin*,1996;48(6):421-424.
- 8 Furusyo N, Koga T, Ai M, *et al.* Utility of glycated albumin for the diagnosis of diabetes mellitus in a Japanese population study: results from the Kyushu and Okinawa Population Study (KOPS). *Diabetologia*,2011;54(12):3028-3036.
- 9 Ma XJ, Pan JM, Bao YQ, *et al.* Combined assessment of glycated albumin and fasting plasma glucose improves the detection of diabetes in Chinese subjects. *Clin Exp Pharmacol Physiol*,2010;37(10):974-979.
- 10 Hu Y, Zhang M, She Y, *et al.* The optimal cut-points of HbA1c for detecting newly diagnosed diabetes and pre-diabetes in the Chinese population living in Sichuan. *Clin Chem Lab Med*,2011;49(12):2117-2118.

(2013-09-18 收稿,2013-12-17 修回)

编辑 沈 进