

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.002016

FNDC5 过表达慢病毒载体的构建及稳定转染 THP-1 细胞系

覃 铮, 刘大男, 肖金翠, 何青松

(贵州医科大学附属医院心内科、贵州医科大学医学科学研究所, 贵阳 550004)

【摘要】目的:构建过表达Ⅲ型纤连蛋白结构域包含蛋白 5(fibronectin type Ⅲ domain-containing protein 5, FNDC5)基因的慢病毒载体,获得稳定转染 FNDC5 的 THP-1 细胞系。**方法:**PCR 扩增目的基因 FNDC5,将目的基因构建入 pLenti-EF1a-EGFP-P2A-Puro 慢病毒载体中,在 DH5 α 感受态细胞中进行扩增,测序及鉴定合格后利用四质粒包装系统转染 293T 细胞,包装成过表达慢病毒颗粒并测定病毒滴度。Western blot 检测重组慢病毒中 FNDC5 的表达情况后,将获得的重组慢病毒转染 THP-1 细胞系,荧光显微镜观察并计算其转染效率。经嘌呤霉素筛选建立 FNDC5 过表达的稳转细胞系后,将细胞分为 3 组,分别为空白组、空载组和 FNDC5 组,用 Western blot 及 RT-PCR 检测其 FNDC5 的表达情况。通过油红 O 染色后观察 FNDC5 过表达对 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞脂质蓄积的影响。**结果:**PCR 产物鉴定及测序结果显示成功构建 FNDC5 过表达慢病毒载体;转染 293T 细胞后可检测到绿色荧光,Western blot 检测 FNDC5-Flag 标签有表达,包装后病毒的滴度为 1.32×10^9 TU/mL;Western blot 及 RT-PCR 检测重组慢病毒转染 THP-1 细胞系,与空载组对比,FNDC5 组中 FNDC5 蛋白表达明显增加[(238.0 $\pm$ 24.9)%],有统计学意义($P=0.000$);与空载组对比,FNDC5 组中 FNDC5 mRNA 表达水平明显增加[(228.5 $\pm$ 3.4)%],有统计学意义($P=0.000$)。FNDC5 过表达转染 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞中的脂质蓄积减少。**结论:**本实验成功构建了 FNDC5 基因的过表达慢病毒载体,通过 FNDC5 过表达慢病毒感染建立了 FNDC5 稳转的 THP-1 细胞系,证明 FNDC5 可明显减少 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞的脂质蓄积,为后续研究奠定基础。

【关键词】FNDC5 基因;动脉粥样硬化;慢病毒载体;稳转细胞系**【中图分类号】**R972+6**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2018-09-15

Construction of lentiviral vectors of fibronectin type Ⅲ domain-containing protein 5 overexpression and stable transfection of THP-1 cell line

Qin Zheng, Liu Danan, Xiao Jincui, He Qingsong

(Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Guizhou Medical University; Institute of Medicine, Guizhou Medical University)

【Abstract】Objective: To construct the lentiviral vector of fibronectin type Ⅲ domain-containing protein 5 (FNDC5) overexpression, and to obtain the THP-1 cell line stably transfected with FNDC5. **Methods:** FNDC5 gene was amplified by PCR and was then inserted to pLenti-EF1a-EGFP-P2A-Puro lentiviral vector. The recombinant vector was amplified in DH5 α competent cells, and after sequencing and identification, the vectors were transfected into 293T cell with the 4-plasmid packaging system to produce overexpression lentiviral particles. Virus titer was then measured. Western blot was used to measure the expression of FNDC5 in recombinant lentivirus; the recombinant lentivirus was transfected into THP-1 cell line, and a fluorescence microscope was used to calculate transfection efficiency. After a stably transfected cell line with FNDC5 overexpression was screened out by puromycin, the cells were divided into blank group, empty group, and FNDC5 group, and Western blot and RT-PCR were used to measure the protein and mRNA expression of FNDC5. Oil red O staining was used to observe the effect of FNDC5 overexpression on lipid accumulation in THP-

1 macrophage-derived foam cells. **Results:** PCR product identification and sequencing results showed that a lentiviral vector of FNDC5 overexpression was successfully constructed. Green fluorescent protein was detected after transfection of 293T cells, and the Flag-tag expression of FNDC5 was detected by Western blot. The titer of the lentivirus after packaging was 1.32×10^9 TU/mL. Western blot and RT-PCR were used to analyze the THP-1 cell line transfected with the lentivirus; compared with the

作者介绍:覃 铮, Email: 155483935@qq.com,

研究方向: 血管疾病基础与临床研究。

通信作者:刘大男, Email: liudan2000@sina.com。**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(编号: 81660083); 贵州省高层次人才创新人才培养计划资助项目(编号: 黔科合人才[2015] 4026 号); 贵州省社会发展公共资助项目(编号: 黔科合 SY[2013]3017 号)。**优先出版:** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190312.1404.022.html>
(2019-03-13)

empty group, the FNDC5 overexpression group had a significant increase in the protein and mRNA expression of FNDC5 ($238.0 \pm 24.9\%$ and $(228.5 \pm 3.4)\%$, respectively, both $P=0.000$). There was a reduction in lipid accumulation in THP-1 macrophage-derived foam cells with FNDC5 overexpression. **Conclusion:** A lentiviral vector of FNDC5 overexpression is successfully constructed in this study and a THP-1 cell line stably transfected with FNDC5 is established by the lentiviral vector of FNDC5 overexpression, indicating that FNDC5 can significantly reduce lipid accumulation in THP-1 macrophage-derived foam cells, which lays a foundation for further research.

[Key words] FNDC5 gene; atherosclerosis; lentiviral vector; stably transfected cell line

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是最常见的心血管疾病之一,其发病机制复杂,涉及脂质代谢紊乱、氧化应激及免疫失调等。泡沫细胞形成是动脉粥样硬化的核心环节,单核巨噬细胞与血管平滑肌细胞吞噬 ox-LDL 形成泡沫细胞,标志着动脉粥样硬化斑块形成^[1]。Ⅲ型纤连蛋白结构域包含蛋白 5 (fibronectin type III domain-containing protein 5, FNDC5)是肌肉因子鸢尾素的前体^[2]。既往研究证实,鸢尾素有消耗能量、促进白色脂肪棕色化、调节脂糖代谢等作用^[3-4]。近期研究发现,鸢尾素可以改善血管内皮功能^[5],抑制 ox-LDL 诱导细胞凋亡,从而抑制或减轻 As^[6]。本课题组前期研究表明,鸢尾素可通过降低血脂、抑制炎症反应等途径减轻或延缓 As 进展^[7]。目前,THP-1 细胞系是运用较多的研究单核巨噬细胞分化及功能的细胞模型^[8],关于 FNDC5 在 As 斑块形成中的作用及机制有待进一步探索,本研究拟构建 FNDC5 过表达慢病毒载体,建立 FNDC5 稳定转染的 THP-1 细胞系,探讨 FNDC5 对 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞脂质蓄积的影响,为进一步探究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

THP-1 细胞(人急性单核白血细胞系)购于齐氏生物科技有限公司;pLenti-EF1a-EGFP-P2A-Puro 慢病毒载体及四质粒包装系统、Polybrene、限制性内切酶 *EcoR* I、293T 细胞均购于上海和元生物技术有限公司;Taq DNA 聚合酶、PrimeSTAR 高保真酶、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒和 DH5 α 感受态细胞均购自北京 Takara 有限公司;AxyPrep 质粒 DNA 小量试剂盒购于爱思进生物技术有限公司;细胞培养基 RPMI-1640、DEME、PMA、胎牛血清 FBS 及嘌呤霉素均购于美国 Gibco 有限公司;Ox-LDL 购于广州奕元生物有限公司;引物及测序均由上海生工有限公司完成;兔源 FNDC5 单克隆抗体购于 Abcam 有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 FNDC5 过表达慢病毒载体的构建及鉴定 在 GenBank 中查找人 FNDC5 基因(NM_153756.2)上下游序列设计并合成引物,根据克隆所需在上下游引物均引入 *EcoR* I 酶切位点。上游引物序列:5'-TGAACCGTCAGATCGAATTTCGC-CACCATGATACACCCCGGTCGCCGAGCG-3';下游引物序列:5'-TCATCCTTGTAGTCCAATTCTATCTTGCTGCCGAGA-AGCCC-3'(下划线为 *EcoR* I 酶切位点)。以 FNDC5 cDNA 为模板,利用 PrimeSTAR 高保真酶,通过 PCR 反应获得含有 *EcoR* I 酶切位点的 cDNA 克隆片段。取 pLenti-EF1a-EGFP-P2A-Puro-3Flag 载体,经 *EcoR* I 酶切使其线性化后胶回收载体片段。将扩增后的目的基因 FNDC5 片段与酶切载体重组反应之后转入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,置于 37℃ 培养箱中培养过夜。挑取出平板上长出的转化子进行菌落 PCR 鉴定。上游引物序列:5'-GCACCAAAATCAACGGGAC-3',下游引物序列:5'-CATAGCGTAAAAAGGAGCAACA-3'。利用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定菌落 PCR 扩增产物,对菌落鉴定得到的阳性克隆进行测序及比对分析。挑选测序结果与设计序列完全一致的克隆用于后续实验。

1.2.2 慢病毒包装 运用四质粒包装系统,将携带外源基因的慢病毒穿梭质粒与辅助包装质粒共转染 293T 细胞。具体过程为:转染前 1 天,将 293T 细胞接种到 100 mm 细胞培养皿中,控制细胞转染时的密度为 70%~80%。转染前 1 h,将细胞培养皿中的培养基更换为 10 mL 的 Opti-MEM 培养基。将待转染的病毒载体质粒 32 μ g(骨架质粒:穿梭质粒=1:1)溶于 Opti-MEM 培养基,总体积为 500 μ L,混匀,静置 5 min。将转染试剂溶于 Opti-MEM 培养基,总体积为 500 μ L,混匀,静置 5 min。将转染试剂稀释液滴加到质粒稀释液中,边加边轻柔混匀,室温静置 20 min,使 DNA 和转染试剂充分结合形成稳定的转染复合体。将配好的 DNA 转染试剂复合体加入细胞培养板中。6 h 后吸去培养基,PBS 洗一次,加入 10 mL 新鲜完全培养基培养。转染 48 h 和 72 h 后,收集含有慢病毒颗粒的细胞上清液,通过离心过滤后收集慢病毒浓缩液,分装后于 -80℃ 保存。

1.2.3 慢病毒滴度测定 滴度检测前 1 天,以每孔 1×10^5 个/500 μ L 的 293T 细胞加入 24 孔板,并分别取病毒 10、1、0.1 μ L 加入到各个细胞培养孔中,无须换液,不加 Polybrene。2 d 后观察 293T 细胞荧光表达情况并抽提其基因组,RT-PCR 检

测滴度。内参基因 BAC 上游引物序列:5'-TCACCCACACT-GTCCCCATCTACGA-3',下游引物序列:5'-CAGCGGAACC-GCTCATTTGCCAATGG-3'。病毒基因组(WPRE)上游引物序列:5'-CCTTTCCGGGACTTTTCGCTTT-3',下游引物序列:5'-GCAGAATCCAGGTGGCAACA-3'。滴度(TU/mL)=($C \times N \times 1\,000$)/V; C =平均每基因组整合的病毒特定基因序列拷贝数, N =感染细胞的数目, V =加入的病毒体积数。

$$C=2^{-[Q_2(WPRE)-Q_2(BAC)]}$$

1.2.4 Western blot 检测过表达质粒中 *FNDC5* 基因的表达情况 将细胞分为 293T 空白组、293T 空载组和 293T *FNDC5* 组,利用 *FNDC5* 过表达慢病毒质粒中目的基因含有的 Flag 标签,通过 Western blot 实验,使用 Flag 标签抗体检测过表达质粒转染 293T 的细胞样品,证明过表达质粒中 *FNDC5* 有表达。

1.2.5 THP-1 细胞培养 复苏冻存的 THP-1 细胞,重悬于含有 10%FBS 的 RPMI 1640 培养基中,加入 1%青链霉素,置于 25 cm² 培养瓶,在 37 ℃、5%CO₂ 细胞培养箱中培养。每 2~3 d 待细胞数达 1×10⁶ 时离心传代。

1.2.6 慢病毒转染及稳定表达 *FNDC5* 的 THP-1 细胞系筛选 将 THP-1 细胞分为空白组(THP-1 细胞)、空载组(空载慢病毒转染 THP-1 细胞)、*FNDC5* 组(转染过表达 *FNDC5* 慢病毒的 THP-1 细胞)。转染前 24 h,将细胞按 1×10⁵ 个/mL 接种于 24 孔板,置于 37 ℃、5%CO₂ 细胞培养箱中培养。24 h 后按不同 MOI(感染复数)加入慢病毒及 Polybrene(5 μg/mL),培养 12 h 后更换培养基,继续培养 72 h 后荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白的表达情况。因本重组慢病毒载体含有嘌呤霉素抗性基因,故加入嘌呤霉素(1 μg/mL)进行筛选,细胞转染后 1~2 d 离心换液或传代,并更换含有嘌呤霉素的培养基,得到的稳转细胞系用于后续检测。

1.2.7 Western blot 及 RT-PCR 检测 *FNDC5* 蛋白及 mRNA 表达 收集 24 孔板中的各组细胞,每孔加入 25 μL RIPA 裂解液(PMSF 1 mg/mL),冰上裂解 30 min,12 000 *g* 高速离心 20 min,取 5 μL 裂解上清 BCA 蛋白定量,其余加入 5×蛋白缓冲液后,煮沸 10 min 待用。取等量蛋白上样,经常规 SDS-PAGE 电泳、恒流转膜 1 h 至 0.22 μm PVDF 膜上、BSA 封闭液室温封闭 1 h,分别加入 *FNDC5* 一抗(1:2 000)、β-actin 一抗(1:5 000)4 ℃孵育过夜,TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,之后分别加入二抗(1:5 000)室温孵育 1 h,再次 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,最后 ECL 化学发光试剂盒显色检测蛋白表达。β-actin 为内参基因,*FNDC5* 蛋白与 β-actin 的灰度比值表示 *FNDC5* 蛋白的相对表达量。内参基因 β-actin 上游引物序列:5'-CAGGAGGCATTGCTGATGAT-3',下游引物序列:5'-GAAGGCTGGGGCTCATTT-3'。目的基因 *FNDC5* 上游引物序列:5'-TGGAGGAGGATACGGAGTACA-3',下游引物序列:5'-CAACATGAACAGGACCACGA-3'。Western blot 采用 Gel-Pro analyzer 4 软件进行条带灰度值分析,RT-PCR 采用 2^{-ΔΔCt} 公式分析实验结果[ΔCt=实验组目的基因平均 Ct 值-对照组目的基因平均 Ct 值-内参基因平均 Ct 值]。

1.2.8 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞模型建立及油红 O 染色 将空载组、*FNDC5* 组同时加入 160 nmol/mL PMA 72 h 诱导成巨噬细胞后加入 50 mg/L ox-LDL 处理 24 h 成为泡沫细胞。使用 4%的多聚甲醛固定 30 min,水洗 3 遍后,用 60%的异丙醇分化数秒。每孔加入已配置好的油红 O 工作液 1 mL,37 ℃下染色 30 min,弃染液,水洗,60%异丙醇脱色数秒,水洗晾干。加入苏木素染液复染 2 min,水洗 3 遍,以 PBS 返蓝数秒,弃去 PBS,放干后光学显微镜下拍照对比。

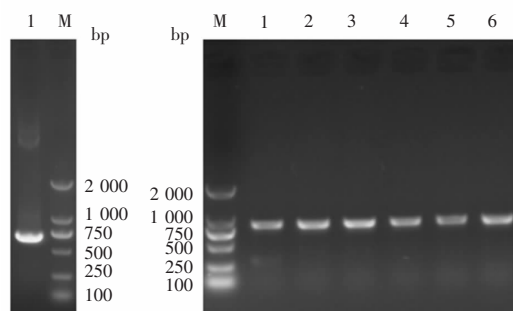
1.3 统计学处理

本实验采用 Prism6.0 进行统计学分析,实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,2 组间均数比较采用 *t* 检验,多组间均数比较采用单因素方差分析。检验水准 α=0.05。

2 结果

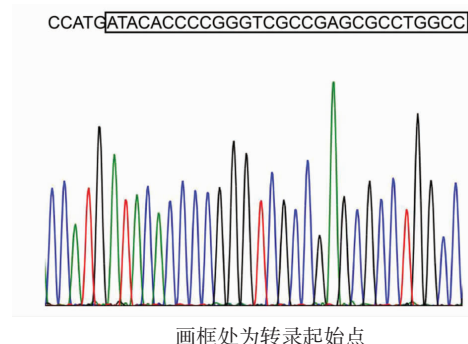
2.1 重组慢病毒载体的构建及鉴定

FNDC5 基因编码序列全长约为 685 bp。经 PCR 扩增后,在 1%琼脂糖凝胶电泳中显示 685 bp 处有明显的目的条带,电泳结果与理论结果一致(图 1A)。慢病毒载体 pLenti-EF1a-EGFP-P2A-Puro-3Flag 经 *EcoR* I 酶切后的片段在 1%琼脂糖凝胶电泳中的条带大小约为 8.8 kb。将其与已扩增的 *FNDC5* 基因片段连接得到的重组质粒,经大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,通过菌落 PCR 挑选阳性克隆,其中 1~6 号转化子为阳性克隆,阳性克隆为 934 bp(图 1B)。挑选阳性克隆进行测序,结果表明 *FNDC5* 过表达慢病毒载体构建成功(图 2)。



1. 为 PCR 扩增
1~6 为阳性克隆, M 为标准分子量 Marker
FNDC5 基因片段

图 1 琼脂糖凝胶电泳鉴定

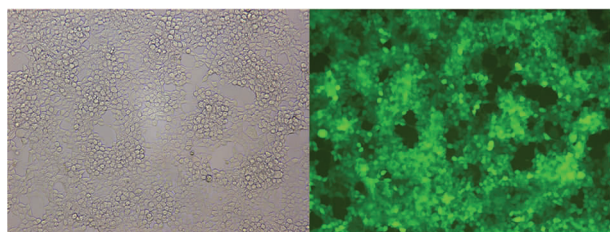


画框处为转录起始点

图 2 *FNDC5* 过表达慢病毒载体测序结果

2.2 滴度测定

选用 293T 细胞包装病毒以供下一步实验用,并检测病毒滴度。在倒置荧光显微镜下观察绿色荧光的表达量,可见大量质粒已经转入 293T 细胞(图 3)。根据 RT-PCR 测定各浓度病毒组的 CT 值及相对表达量,经计算得到病毒滴度为 1.32×10^9 TU/mL,病毒包装成功。



光学显微镜

荧光显微镜

图 3 FND C5 过表达慢病毒转染 293T 细胞后绿色荧光表达 (100×)

2.3 Western blot 检测过表达质粒中 Flag 基因的表达

过表达质粒中的目的基因 *FND C5*,与 *Flag* 基因融合后预测对应蛋白大小约为 23 kD。将 *FND C5* 过表达慢病毒质粒转染 293T 细胞,Western blot 检测样品中 *Flag* 蛋白的表达实验结果表明 23 kD 有条带出现(图 4)。

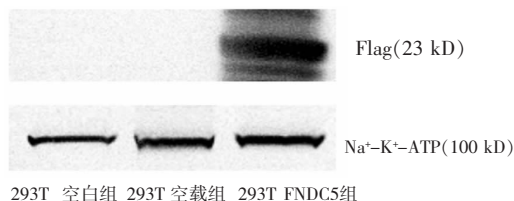
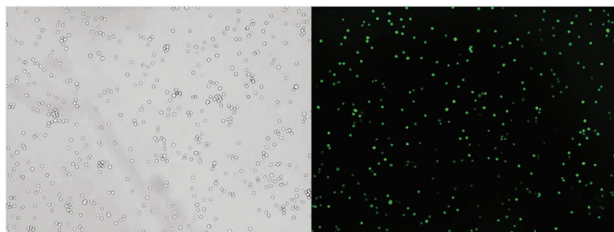


图 4 Western blot 检测过表达质粒中 *Flag* 基因的表达

2.4 慢病毒转染 THP-1 细胞及稳定细胞系的筛选

慢病毒(MOI=100)转染 THP-1 细胞 72 h 后,在倒置荧光显微镜下观察可见绿色荧光,经嘌呤霉素筛选后,细胞无明显形态学变化,生长状态良好,稳定持续表达绿色荧光。转染效率=绿色荧光细胞数/总细胞数 $\times 100\%$ 。转染效率=(78.30 ± 6.10)%,*FND C5* 稳定转染的 THP-1 细胞系构建成功(图 5)。



光学显微镜

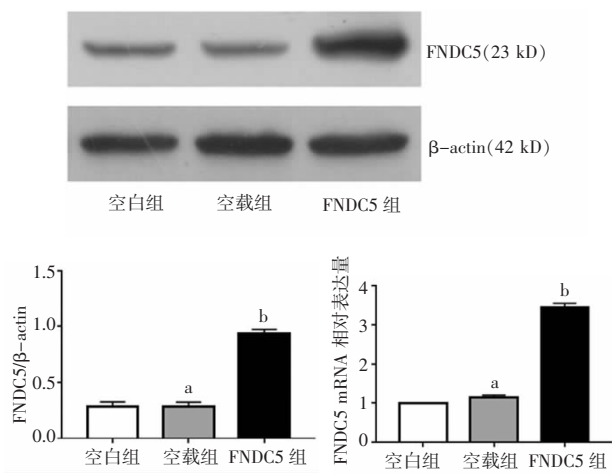
荧光显微镜

图 5 FND C5 过表达慢病毒转染 THP-1 细胞后绿色荧光表达 (100×)

2.5 Western blot 及 RT-PCR 检测转染后 THP-1 细胞内 FND C5 蛋白及 mRNA 表达

应用 Western blot 及 RT-PCR 检测稳转 THP-1 细胞,

空载组与空白组对比,*FND C5* 蛋白及 mRNA 表达水平均无统计学差异($P>0.05$)。与空载组对比,*FND C5* 组中 *FND C5* 蛋白表达明显增加[(238.0 ± 24.9)%],差异有统计学意义($P=0.000$)(图 6A、B);与空载组对比,*FND C5* 组中 *FND C5* mRNA 表达水平明显增加[(228.5 ± 3.4)%],差异有统计学意义($P=0.000$)(图 6C)。

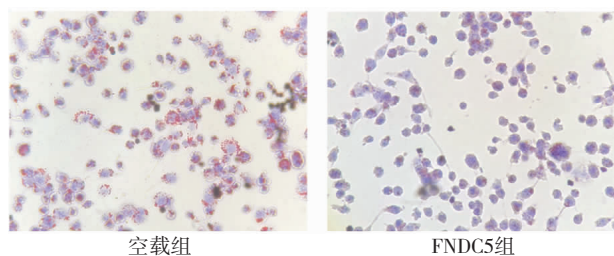


注:a,与空白组比较, $P>0.05$;b:与空载组比较, $P=0.000$

图 6 FND C5 过表达慢病毒转染 THP-1 细胞后 Western blot 及 RT-PCR 检测 *FND C5* 蛋白及 mRNA 的表达 ($n=3$)

2.6 泡沫细胞模型建立及油红 O 染色

通过油红 O 染色检测空载组与 *FND C5* 组,THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞中脂质蓄积。与空载组相比,*FND C5* 组中脂滴蓄积减少(图 7)。



空载组

FND C5组

图 7 油红 O 染色

3 讨论

鸢尾素是在骨骼肌中发现的一种肌肉因子,由 112 个氨基酸构成,分子量为 12 kD。鸢尾素来源于前体蛋白 *FND C5*,又称为 III 型纤连蛋白结构域包含蛋白 5,*FND C5* 蛋白分子由信号肽(29 个氨基酸)、III 型纤连蛋白组件(112 个氨基酸)和 C-端跨膜结构域(65 个氨基酸)3 部分构成,经蛋白酶在细胞膜上水解剪切后形成分泌型 *FND C5* 多肽片段即鸢尾素

分子,进入循环系统^[9]。

FNDC5 为过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活子 1α (peroxisome proliferator activated receptor, PPAR γ) 辅助激活因子- 1α (PPAR γ coactivator- 1α , PGC- 1α) 的靶基因^[10], 运动后 PGC- 1α 表达增高,引起 FNDC5 增高, FNDC5 通过增加下游 PPAR α 的表达作用于解偶联蛋白-1 (UCP-1), 促进皮下脂肪产热,使白色脂肪棕色化^[1]。有研究报道,鸢尾素能抑制高脂饮食 2 型糖尿病小鼠的核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 激活,从而减少内皮细胞黏附分子表达及单核-巨噬细胞黏附血管内皮,进而减轻 As 的发生发展^[5]。近期研究表明,鸢尾素可以抑制 ox-LDL 诱导细胞凋亡,从而抑制或减轻 As^[6]。本课题组前期研究发现,通过给予 ApoE -/- 小鼠高脂饮食建立 As 模型的基础上给予鸢尾素干预,结果发现鸢尾素能有效使 As 程度减轻、斑块面积缩小、内膜增厚减轻^[7]。可见 FNDC5 对 As 有重要的影响,但 FNDC5 在抑制或减轻动脉粥样硬化斑块中所起的作用及机制目前仍不清楚。为完成上述研究,需建立一个过表达 FNDC5 的单核巨噬细胞源性泡沫细胞模型,研究其对动脉粥样硬化斑块的影响。

THP-1 细胞系来源于人白血病单核细胞系,其细胞功能可以完整地代表人单核巨噬细胞系统的功能,因此 THP-1 细胞系被广泛用于研究单核巨噬细胞分化及功能的细胞模型^[11-13]。建立稳定的单核巨噬细胞源性泡沫细胞模型对研究 As 有重要意义^[8]。本实验采用慢病毒载体过表达目的基因,相对于其他转染方式,慢病毒不仅具有致病性低、转染效率高及可转染各个细胞周期的细胞等特点,更重要的是能将外源基因有效整合到宿主染色体上,从而筛选出稳定转染的细胞系^[14]。

本研究应用 pLenti-EF1a-EGFP-P2A-Puro-3Flag 质粒成功构建了 FNDC5 过表达慢病毒载体,经包装后获得了高滴度的 FNDC5 过表达慢病毒。将携带 EGFP 的慢病毒载体转染 THP-1 细胞系后,可直观通过细胞荧光强度及数量观察转染效率,经过药物筛选及培养后获得稳定转染的 THP-1 细胞系,Western blot 及 RT-PCR 实验结果也表明慢病毒转染后 THP-1 细胞内 FNDC5 蛋白及 mRNA 水平显著提高。本研究成功构建了 FNDC5 基因的过

表达慢病毒载体及 THP-1 稳转细胞系 (FNDC5),油红 O 染色证明 FNDC5 可明显减少 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞的脂质蓄积,为本课题组进一步研究 FNDC5 在 As 中的作用及机制奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Wang T, Palucci D, Law K, et al. Atherosclerosis: pathogenesis and pathology[J]. Diagn Histopathol, 2012, 18(11): 461-467.
- [2] Huh JY, Dincer F, Mesfum E, et al. Irisin stimulates muscle growth-related genes and regulates adipocyte differentiation and metabolism in humans[J]. Int J Obes, 2014, 38(12): 1538-1544.
- [3] Boström P, Wu J, Jedrychowski MP, et al. A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis[J]. Nature, 2013, 481(4): 463-468.
- [4] Aydin S, Kuloglu T, Aydin S. Copeptin, adropin and irisin concentrations in breast milk and plasma of healthy women and those with gestational diabetes mellitus[J]. Peptides, 2013, 47(9): 66-70.
- [5] Zhu D, Wang H, Zhang J, et al. Irisin improves endothelial function in type 2 diabetes through reducing oxidative/nitrative stresses[J]. J Mol Cell Cardiol, 2015, 87: 138-147.
- [6] Zhang Y, Song H, Yuan Z, et al. Irisin inhibits atherosclerosis by promoting endothelial proliferation through microRNA 126-5p[J]. J Am Heart Assoc, 2016, 5(9): e004031.
- [7] 谭 娟, 刘大男, 何青松, 等. 鸢尾素对载脂蛋白 E 基因敲除小鼠动脉粥样硬化的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2017, 25(8): 773-777.
- [8] Auwerx J. The human leukemia cell line, THP-1; a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation[J]. Experimentia, 1991, 47(1): 22-31.
- [9] Erickson HP. Irisin and FNDC5 in retrospect: an exercise hormone or a transmembrane receptor?[J]. Adipocyte, 2013, 2(4): 289-293.
- [10] Yang Z, Chen X, Chen Y, et al. PGC-1 mediates the regulation of metformin in muscle irisin expression and function[J]. Am J Transl Res, 2015, 7(10): 1850-1859.
- [11] Teale T, Tripathi S, Hartshorn KL. Defensins and cathelicidins in lung immunity[J]. Innate Immunity, 2010, 16(3): 151-159.
- [12] Kohchi C, Inagawa H, Nishizawa T, et al. ROS and innate immunity[J]. Anticancer Res, 2009, 29(3): 817-821.
- [13] Praveen P, Matthias M, Björn W, et al. Antimicrobial activity of peptides derived from human β -amyloid precursor protein[J]. J Pept Sci, 2012, 18(3): 183-191.
- [14] Matrai J, Chuah MT. Recent advances in lentiviral vector development and applications[J]. Mol Ther, 2010, 18(3): 477-490.

(责任编辑: 张辉洁)