文章编号:1000-5404(2011)14-1471-05

论著

insig-1基因siRNA干扰质粒的构建及对炎症状态下细胞胆固醇代谢的影响

柯大智,陈庆伟,李桂琼,邓 玮,莫显刚 (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院老年病科)

[摘要] **目的** 构建针对insig-1基因的siRNA表达载体,观察其对炎症状态下RAW264.7小鼠巨噬细胞胆固醇代谢的影响。**方法** 根据insig-1核苷酸序列,设计并构建针对insig-1基因mRNA的3个特异性siRNA表达载体(si-1、si-2、si-3)和1个无同源性的阴性对照载体(si-nc),经酶切和测序鉴定确认siRNA载体构建成功后,转染RAW264.7小鼠巨噬细胞,RT-PCR、免疫组化法检测insig-1基因的表达,筛选出最佳抑制基因后,应用酶学方法和油红O染色观察炎症处理后RAW264.7细胞内胆固醇含量的变化。**结果** 经酶切证实,siRNA表达载体构建成功,RT-PCR、Western blot、免疫组化法显示与未转染组相比,si-1、si-2、si-3组RAW264.7细胞中insig-1的mRNA和蛋白表达水平均明显降低($P<0.05$),其中si-2干扰效果最强。酶学方法和油红O染色结果表明,炎症状态下细胞insig-1沉默后胆固醇的含量和油红O颗粒增多。**结论** 成功构建了insig-1基因siRNA干扰质粒,insig-1缺失对炎症状态下细胞胆固醇摄取有促进作用。

[关键词] insig-1基因;RNA干扰;siRNA质粒载体;巨噬细胞RAW264.7
[中图法分类号] R394-33;R394.3 [文献标志码] A

Construction of plasmids carrying siRNA targeting insig-1 gene and effect of insig-1 absence on cholesterol metabolism in inflammation-induced cells

Ke Dazhi, Chen Qingwei, Li Guiqiong, Deng Wei, Mo Xiangang (Department of Geriatrics Cardiology, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

[**Abstract**] **Objective** To construct plasmids carrying siRNA targeting insulin induced gene 1 (insig-1), and to observe the effect of insig-1 absence on cholesterol metabolism in mouse macrophagocyte RAW264.7 treated with inflammatory factor. **Methods** Three siRNA expression plasmids (si-1, si-2 and si-3) targeting insig-1 mRNA and one non-homologous negative control plasmid (si-nc) were constructed based on the nucleotide sequence of insig-1, and were identified by enzyme digestion and sequencing. After RAW264.7 cells were transformed with the plasmids, the insig-1 expression was determined by RT-PCR, Western blotting and immunohistochemical assay, and the plasmid with the best inhibitory effect on insig-1 expression was screened out. The cholesterol content of inflammation-induced RAW264.7 cells was measured with enzymatic method and Oil Red O staining. **Results** The siRNA expression plasmids were constructed. The expression of insig-1 mRNA and protein decreased significantly in RAW264.7 cells transformed with si-1, si-2 or si-3 as compared with that in untransformed cells ($P<0.05$), and the interfering effect of si-2 on insig-1 expression was the best. After insig-1 gene was silenced, inflammation-induced RAW264.7 cells showed significantly increased cholesterol and Oil Red O particles. **Conclusion** Plasmids carrying siRNA targeting insig-1 gene are constructed, and insig-1 absence may enhance the cholesterol uptake of inflammation-induced cells.

[**Key words**] insig-1; RNAi; siRNA plasmid; RAW264.7

Supported by the Project of Medical Research of Chongqing Municipal Health Bureau (2009-2-208). Corresponding author: Chen Qingwei, Tel: 86-23-63693612, E-mail: chenqwcq@yahoo.com.cn

胰岛素诱导基因(insulin induced gene, insig)是近年来发现的调控脂肪代谢的重要因子。insig-1[1]和insig-2[2]为其2个亚型,二者主要通过与固醇调节元件结合蛋白(sterol regulatory element binding protein, SREBPs)及SREBPs裂解活化蛋白(SREBPs cleavage activating protein, SCAP)相结合,以insigs-SCAP-SREBPs复合物的形式储存于内质网上,在细胞内胆固醇的参与下,影响SREBPs的活化,调节细胞表面低密度脂蛋白受体(low density lipoprotein receptor, LDLr)的转录,进而反馈调节细胞对外源性胆固醇的摄取[3]。近

[基金项目] 重庆市卫生局医学科研计划项目(2009-2-208)
[通信作者] 陈庆伟,电话:(023)63693612, E-mail:chenqwcq@yahoo.com.cn

来 Chen 等[4-5]体外实验发现炎症因子(TNF-α、IL-1)可增强 SCAP、SREBPs 的异常表达,并促进 SCAP-SREBPs 从内质网向高尔基体的转移及 SREBPs 的活化,从而增强 LDLr 的表达,最终使细胞外胆固醇经 LDLr 途径源源不断进入并沉积于细胞。由于 insig 在 insigs-SCAP-SREBPs 胆固醇摄取的反馈通路中处于主导地位,那么炎症在促进 SCAP-SREBPs 核转移及 SREBPs 活化过程中 insig 具体扮演着什么角色,炎症是否通过 insig 而作用于 SCAP-SREBPs,其对 insig 有何影响?为此,本实验将沉默 insig 基因,构建小鼠 insig 基因 RNA 干扰(RNA interference,RNAi)质粒并转染 RAW264.7 小鼠巨噬细胞,同时用炎症因子处理细胞,观察 insig 沉默后细胞胆固醇含量的变化,了解 insig siRNA 对炎症促进细胞胆固醇摄取过程中是否有促进或协同作用,旨在为进一步研究 insig-1 在炎症诱导巨噬细胞脂质蓄积过程中的作用和机制打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株 pGenesil-1 质粒购自武汉晶赛公司,*E. coli* DH5α 由细胞生物学实验室何晓燕博士馈赠,RAW264.7 细胞由本校感染实验室保存。

1.1.2 试剂和仪器 Lipofectamine™ 2000 转染试剂及 Trizol 购自美国 Invitrogen 公司,T_4 DNA 连接酶、各种限制性内切酶、DNA marker 和反转录试剂盒[TaKaRa RNA PCR kit(AMV) Ver.3.0]购自宝生物工程(大连)有限公司,兔抗鼠 insig-1 购自 Santa Cruz 公司,HRP 标记的羊抗兔 IgG、兔 S-P 检测试剂盒及 DAB 购自北京中杉金桥生物技术有限公司,油红 O 购自生物工程有限公司(上海),LDL 购自广州威佳科技有限公司,脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)、胆固醇氧化酶、辣根过氧化物酶、Sodium cholate Hydrate、Triton X-100、安替比林、苯酚等均购自 Sigma 公司,TCS-SP2 激光共聚焦显微镜、LMD 激光显微切割系统购自德国徕卡公司,在 TE2000-U 型显微镜购自日本 NIKON 公司,凝胶成像仪购于 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 siRNA 分子的设计 根据 GenBank 报道的小鼠 insig-1 基因序列(NM_153526),利用 Ambion 公司 siRNA 在线设计软件,设计针对小鼠 insig-1 基因 mRNA 的靶位点序列,包括 3 个特异匹配位点和 1 个随机错配的寡核苷酸片段。根据载体特性,合成发夹结构 shRNA 对应的 DNA 序列。shRNA 发夹结构序列长度为 65 bp,其顺序为 *Bam*HⅠ酶切位点,19 nt 正义序列,9 nt 茎环序列,19 nt 反义序列,RNA 聚合酶Ⅲ终止子(6 个 T),*Sal*Ⅰ酶切位点,*Hind*Ⅲ酶切位点。序列由上海生工生物技术公司合成。

1.2.2 siRNA 真核表达质粒载体的构建 将上述 DNA 模板链退火后,用 T_4 DNA 连接酶将其定向克隆至经 *Bam*HⅠ和 *Hind*Ⅲ双酶切后的线性化 pGenesil-1 质粒中,转化大肠杆菌 DH5α 感受态,筛选卡那霉素抗性克隆,挑取阳性克隆,分别经 *Sal*Ⅰ和 *Pst*Ⅰ单酶切鉴定,阳性克隆送上海生工生物工程技术服务有限公司测序,测序正确的分别命名为 si-1、si-2、si-3 及 si-nc,其中 si-nc 为阴性对照质粒。

1.2.3 siRNA 真核表达载体转染 RAW264.7 细胞后绿色荧光信号观察 用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基于 37 ℃,5% CO_2 的培养箱中培养 RAW264.7 小鼠巨噬细胞。细胞至对数生长期时,以每孔 2×10^5 个接种于 6 孔培养板,细胞汇合度达 80% 左右时,利用 Lipofectamine™ 2000 分别将 si-1、si-2、si-3、si-nc 质粒瞬时转染 RAW264.7 细胞,其中以未转染细胞为对照组,每组设 3 个复孔。继续培养 48 h,用 TCS-SP2 激光共聚焦显微镜观察各组转染细胞增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein,EGFP)表达情况。

1.2.4 RT-PCR 检测 mRNA 的表达 收集各组转染 48 h 的细胞,用 Trizol 试剂抽提细胞总 RNA。以提取的总 RNA 为模板,利用 Oligo-dT 引物合成 cDNA 第 1 链,再以 cDNA 链为模板进行 PCR 反应。PCR 反应体系为:*Ex Taq* HS 酶 0.25 μl,cDNA 模板 5 μl,5 × PCR buffer 10 μl,引物各 0.5 μl,dNTP(各 10 mmmol/L)1 μl,去离子水 32.75 μl。PCR 反应条件为:94 ℃ 2 min;94 ℃ 30 s,58 ℃ 30 s,72 ℃ 1.5 min,30 个循环;72 ℃ 10 min。insig-1 引物上游:5′-AGGACGACAGTTAGCTATGGGT-G-3′,下游:5′-CCCCCTTACCCGACTTTCACATAC-3′,PCR 产物为 306 bp。GAPDH 为内参照,其引物上游:5′-ACCACAGTC-CATGCCATCAC-3′,下游:5′-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3′,PCR 产物为 452 bp。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳,由 Bio-Rad 凝胶成像仪摄取凝胶图像,用 Quantity One 进行半定量分析,实验重复 3 次。

1.2.5 Western blot 检测蛋白的表达 收集各组转染 48 h 后的细胞,用 RIPA 总蛋白抽提试剂盒提取细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。经 SDS-PAGE 凝胶电泳后转膜,室温封闭 2 h,加入一抗(insig-1 1∶300;β-actin 1∶400),4 ℃过夜;TBS 洗膜 3 次后加二抗(1∶1 000)37 ℃孵育 1 h,用 TBS 洗膜 3 次后,ECL 化学发光显色,由 Bio-Rad 凝胶成像仪摄取凝胶图像,用 Quantity One 软件进行光密度分析,insig-1 的表达以其光密度与 β-actin 的光密度比值表示,实验重复 3 次。

1.2.6 免疫细胞化学检测靶蛋白的表达 细胞爬片过夜后,经上述不同 siRNA 表达质粒转染 48 h 后,4% 多聚甲醛固定 30 min,PBS 清洗 3 次。然后用 3% H_2O_2 孵育 10 min 去除内源性过氧化物酶;正常羊血清作用 10 min 去除非特异性结合物质;兔抗鼠 insig-1(1∶50),4 ℃孵育过夜。次日,用生物素标记的羊抗兔 IgG,37 ℃孵育 30 min;辣根酶标记链霉卵白素工作液作用 30 min;最后加入 DAB 底物显色,苏木精复染胞核。LMD 激光显微切割系统采集图像。

1.2.7 酶学方法测定细胞内胆固醇含量[6-7] 按 1.2.3 方法培养细胞,利用 Lipofectamine™2000 将上述筛选出的最强干扰质粒和阴性质粒转染细胞,以未转染为空白对照,阴性质粒转染为阴性对照。收集各组培养 48 h 细胞,PBS 充分洗涤,用无血清培养基(实验培养基)处理 4 h,加入 LDL 50 μg/ml(用 10% EDTA 0.56 ml 防腐、防氧化)、LPS 200 ng/ml 处理 24 h,经胰酶消化收集 6 孔板内生长的细胞(约 5×10^5 个细胞/孔),加入 1 ml 氯仿/甲醇(2∶1)液,超声破碎细胞,收集上清真空干燥,沉淀溶于 130 μl 95% 乙醇。分别取 50 μl 加入 300 μl 含 5 U/ml 胆固醇氧化酶、50 U/ml 辣根过氧化物酶、20 mmmol/L Sodium

cholate Hydrate、1% Triton X-100、5.5 mmol/L 安替比林、280 mmol/L 苯酚、25 U/ml 胆固醇酯水解酶的溶液中，37 ℃反应30 min，96 孔板酶标仪检测 500 nm 光密度值，测定胞内总胆固醇含量（total cholesterol，TC）和游离胆固醇（free cholesterol，FC）含量（反应液中不加入胆固醇酯水解酶），并用已知浓度的胆固醇作标准曲线，同时用 Lowry 法检测细胞碎片的蛋白含量来标化各细胞样本的胆固醇值。总胆固醇含量减去游离胆固醇含量即为胆固醇酯（cholesterol ester，CE）的含量。

1.2.8 细胞油红 O 染色 按 1.2.6 方法处理并收集各组转染细胞爬片 48 h 后，用无血清的培养基换液处理 4 h，加入 LDL 50 μg/ml（用 10% EDTA 0.56 ml 防腐、防氧化）、LPS 200 ng/ml 处理 24 h。收集细胞，PBS 洗涤、5% 福尔马林生理盐水固定细胞 30 min。室温下，用油红 O 工作液染色 30 min，去离子水漂洗、苏木精复染 2 min，50% PBS 甘油封片于载玻片上，在 NIKON TE2000-U 型显微镜下观察并照相。

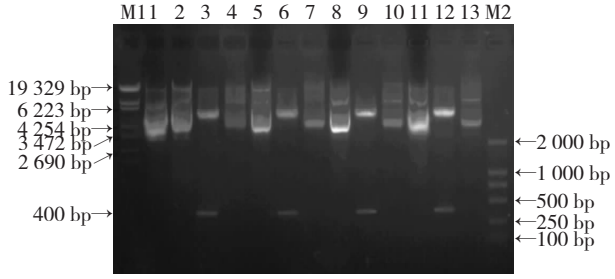
1.3 统计学处理

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 12.0 统计软件，两样本比较行 t 检验。

2 结果

2.1 insig-1 基因 siRNA 重组表达质粒的构建和鉴定

重组表达质粒经 *Sal* Ⅰ单酶切得到 1 条约 350 bp 目的条带，而经 *Pst* Ⅰ单酶切，仅可见线性载体条带，初步表明重组质粒构建成功（图 1）。随后测序结果显示，重组质粒中的目的序列与设计的寡核苷酸序列完全一致，证实重组质粒构建成功。



M1：DNA 标准 λ-EcoT14 Ⅰ；1：pGenesil-1；2：si-1；3：si-1 经 *Sal* Ⅰ单酶切；4：si-1 经 *Pst* Ⅰ单酶切；5：si-2；6：si-2 经 *Sal* Ⅰ单酶切；7：si-2 经 *Pst* Ⅰ单酶切；8：si-3；9：si-3 经 *Sal* Ⅰ单酶切；10：si-3 经 *Pst* Ⅰ单酶切；11：si-nc；12：si-nc 经 *Sal* Ⅰ单酶切；13：si-nc 经 *Pst* Ⅰ单酶切；M2：DNA 标准（DL 2 000）

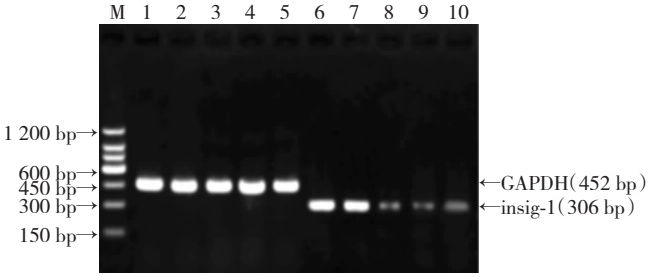
图 1 insig-1 基因的 siRNA 表达质粒的酶切鉴定

2.2 siRNA 真核质粒表达载体转染细胞后 EGFP 的表达

构建的干扰质粒（携带有绿色荧光蛋白基因）经 Lipofectamine™ 2000 转染细胞 48 h 后激光共聚焦显微镜下可见转染各质粒的细胞带荧光的数量增多，荧光强度增强，未转染质粒的细胞则未出现荧光。见图 2。

2.3 RT-PCR 检测细胞 insig-1 mRNA 的表达

不同质粒转染细胞 48 h 后，在 306 bp 和 452 bp 处均可见 insig-1 基因和内参 GAPDH 基因条带，Quantity One 进行半定量分析显示，si-1、si-2 和 si-3 组细胞的 insig-1 基因 mRNA 水平降低，与未转染组相比，分别下降 42%、65% 和 25%，差异具有统计学意义（$P<0.05$）；而 si-nc 组 insig-1 的表达无明显变化（$P>0.05$）。见图 3。

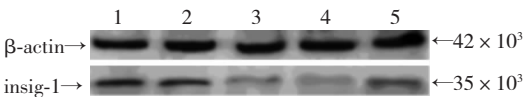


M：150 bp 梯度标准；1，6：未转染组；2，7：si-nc 组；3，8：si-1 组；4，9：si-2 组；5，10：si-3 组

图 3 RT-PCR 检测 insig-1 干扰质粒对 RAW264.7 细胞中 insig-1 mRNA 的表达

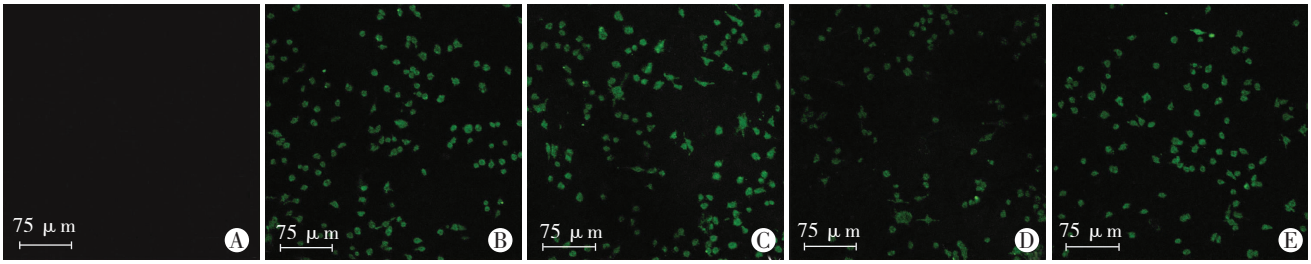
2.4 Western blot 检测细胞 insig-1 蛋白的表达

不同质粒转染细胞 48 h 后，各处理组在约 35×10^3、42×10^3 处均可见 insig-1 蛋白和 β-actin 蛋白条带，Quantity One 软件进行光密度分析显示，与未转染组相比，si-1、si-2 和 si-3 组细胞的 insig-1 蛋白水平降低，分别下降了 58%、79% 和 30%，差异具有统计学意义（$P<0.05$）；而 si-nc 组 insig-1 的表达无明显变化（$P>0.05$）。见图 4。



1：未转染组；2：si-nc 组；3：si-1 组；4：si-2 组；5：si-3 组

图 4 Western blot 检测 insig-1 干扰质粒对 RAW264.7 细胞中 insig-1 蛋白的表达



A：未转染组；B：si-nc 组；C：si-1 组；D：si-2 组；E：si-3 组

图 2 siRNA 真核质粒表达载体转染细胞 48 h 后 EGFP 的表达（激光共聚焦显微镜 ×200）

2.5 免疫细胞化学检测细胞 insig-1 蛋白的表达

不同质粒转染细胞 48 h 后，免疫细胞化学检测结果见图5，si-1、si-2 和 si-3 组细胞胞质染色较浅，灰度值较未转染组明显降低（$P<0.05$）；而 si-nc 组 insig-1 的表达无明显变化（$P>0.05$）。

2.6 细胞内胆固醇含量

筛选出最强干扰质粒 si-2，将其转染细胞 48 h 后，可见 si-2 组细胞胆固醇含量较未转染组和 si-nc 组高（$P<0.05$）。见表1。

表1 酶化学法检测各组 RAW264.7 细胞内胆固醇含量（μg/mg，$\bar{x}\pm s$）

组别	TC	CE	FC
未转染组	13.2±1.8[a]	3.4±1.2[a]	9.8±1.8[a]
si-2 组	19.8±2.0	7.4±2.0	12.4±1.6
si-nc 组	13.9±2.0[a]	4.4±1.9[a]	9.5±1.9[a]

a：$P<0.05$，与 si-2 组比较

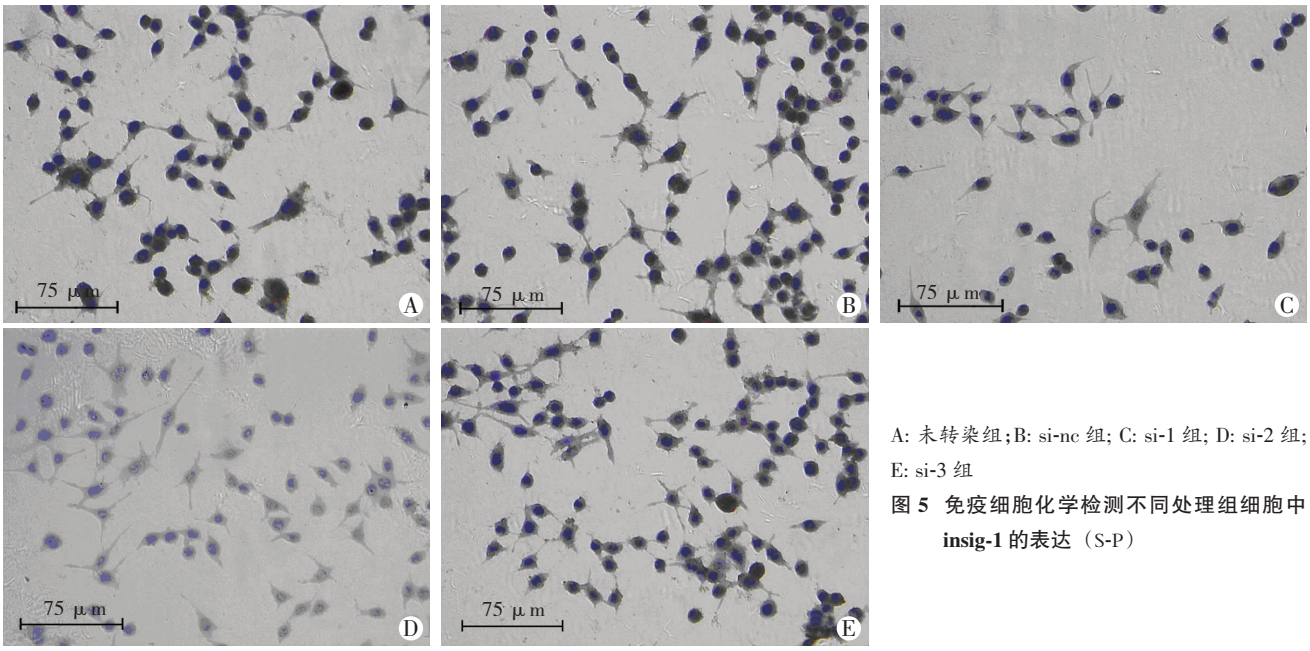
2.7 油红 O 染色

筛选出最强干扰质粒 si-2，将其转染细胞。si-2 组细胞胞质内含大量油红 O 颗粒，而未转染组和 si-nc 组含少量油红 O 颗粒。见图6。

3 讨论

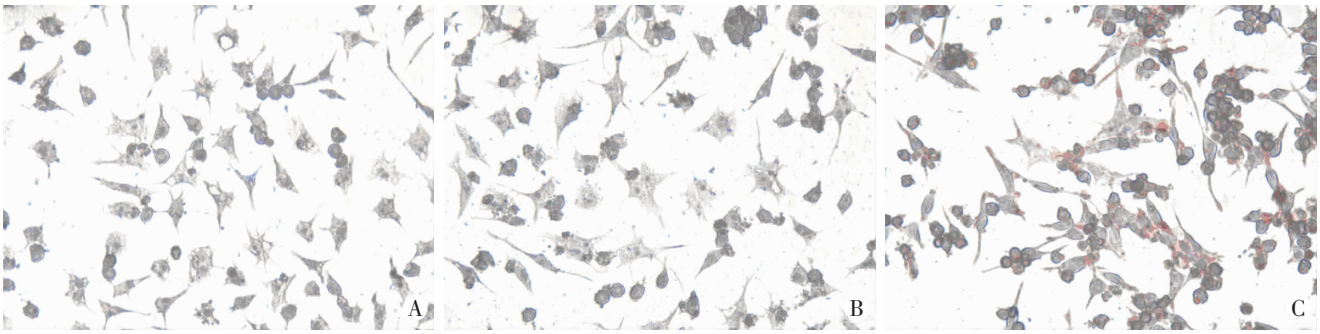
insigs 基因的主要功能是调控脂质代谢。在脂代谢过程中，insig-1 和 insig-2 既有与固醇反应区相结合形成 insigs-SCAP-SREBPs 复合物的功能，也存在着某些差异。在外源性固醇缺乏时，insig-1 的高表达能够阻断 SCAP 的转运，而 insig-2 则不能[8]。insig-1 的产生需要核 SREBPs，而 insig-2 不需要[9]。因此本研究选择构建了 insig-1 RNA 干扰质粒。RNAi 技术是一种有效的基因沉默手段，能高效、特异地抑制细胞内基因的表达，被广泛应用于基因功能、信号转导、抗肿瘤等的研究[10-12]。

本实验中选用 pGenesil-1 干扰表达质粒，该质粒含有 1 个 U6 启动子，带有卡那霉素及新霉素抗性基因，分别用于原核细胞及真核细胞的筛选，此外，还带



A: 未转染组；B: si-nc 组；C: si-1 组；D: si-2 组；E: si-3 组

图5 免疫细胞化学检测不同处理组细胞中 insig-1 的表达（S-P）



A：未转染组；B：si-nc 组；C：si-2 组

图6 转染 RAW264.7 细胞油红 O 染色结果（LM ×400）

有1个EGFP基因,便于进行转染效率的观察。在U6启动子的后面有1个多克隆位点(MCS),在MSC区域*Bam*HⅠ和*Hind*Ⅲ之间有*Sal*Ⅰ和*Pst*Ⅰ酶切位点。我们对pGenesil-1进行*Bam*HⅠ和*Hind*Ⅲ双酶切获得线性化大片段的过程中,失去了这两个位点,为了方便重组质粒的鉴定,在插入的目的基因片段中,我们加入1个*Sal*Ⅰ酶切位点。如果插入正确,就能被*Sal*Ⅰ酶切出1条约350 bp的条带;而用*Pst*Ⅰ酶切时,则不能切开。本研究将退火形成的双链正确插入线性化质粒载体是RNA干扰的关键。质粒载体转入细胞,环序列使转录出的RNA链折叠成发夹结构的shRNA,shRNA环状结构被Dicer切除后产生siRNA,在细胞内产生基因沉默。本实验通过PCR和DNA测序显示shRNA序列和设计相符,4个构建siRNA表达载体正确,说明沉默载体构建有效。

将4个siRNA表达载体转染至RAW264.7细胞,与未转染组相比,各组均有荧光的表达,表明我们成功将质粒转染入细胞中。RT-PCR和Western blot均显示si-2组insig-1表达量最低,表明在蛋白和mRNA水平上si-2对目标基因有最明显的抑制效果,免疫细胞化学的结果也在蛋白水平上证实了si-2对insig-1表达有最明显的抑制作用。该结果也为下一步进行RAW264.7细胞中insig-1的功能研究奠定了有利的实验基础。

生理状态下细胞内胆固醇摄取的负反馈调节是由insigs介导的insigs-SCAP-SREBPs-LDLr途径:当细胞胆固醇浓度升高,insig-1与SCAP结合阻断SCAP携带SREBPs由内质网向高尔基体的转移;相反,当细胞胆固醇浓度降低,则insig-1与SCAP结合降低,SCAP运输SREBP从内质网到高尔基体实现活化。因此,决定SCAP是否从内质网逃逸取决于内质网内游离胆固醇的含量和内质网蛋白insig的水平。Chen等[4-5]体外实验表明,不论细胞内是否存在高胆固醇负荷,炎症因子都可促进细胞内SCAP携带SREBPs由内质网向高尔基体的转移进而促进细胞表面LDLr的表达,而insigs在此过程中的作用和机理尚不清楚。在本研究中,转染insig-1 siRNA细胞较单纯炎症处理细胞游离胆固醇含量和油红颗粒含量均明显增加,表明insig-1基因沉默对炎症状态下细胞荷脂起促进作用,但具体机制还有待进一步研究。我们将进一步应用该干扰质粒在后续的以小鼠炎症疾病模型中,为"以insig-1基因为靶点"的抗动脉粥样硬化研究提供参考。

参考文献:

[1] Radhakrishnan A, Ikeda Y, Kwon H J, *et al*. Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: oxysterols block transport by binding to Insig[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(16): 6511-6518.

[2] Lee P C, Sever N, Debose-Boyd R A. Isolation of sterol-resistant Chinese hamster ovary cells with genetic deficiencies in both Insig-1 and Insig-2[J]. J Biol Chem, 2005, 280(26): 25242-25249.

[3] Gong Y, Lee J N, Lee P C, *et al*. Sterol-regulated ubiquitination and degradation of Insig-1 creates a convergent mechanism for feedback control of cholesterol synthesis and uptake[J]. Cell Metab, 2006, 3(1): 15-24.

[4] Chen Y, Ruan X Z, Li Q, *et al*. Inflammatory cytokines disrupt LDL-receptor feedback regulation and cause statin resistance: a comparative study in human hepatic cells and mesangial cells[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2007, 293(3): F680-F687.

[5] Chen Y X, Ruan X Z, Huang A L, *et al*. Mechanisms of dysregulation of low-density lipoprotein receptor expression in HepG2 cells induced by inflammatory cytokines[J]. Chin Med J (Engl), 2007, 120(24): 2185-2190.

[6] Gallo L L, Atasoy R, Vahouny G V, *et al*. Enzymatic assay for cholesterol ester hydrolase activity[J]. J Lipid Res, 1978, 19(7): 913-916.

[7] Gamble W, Vaughan M, Kruth H S, *et al*. Procedure for determination of free and total cholesterol in micro- or nanogram amounts suitable for studies with cultured cells[J]. J Lipid Res, 1978, 19(8): 1068-1070.

[8] Takaishi K, Duplomb L, Wang M Y, *et al*. Hepatic Insig-1 or -2 overexpression reduces lipogenesis in obese Zucker diabetic fatty rats and in fasted/refed normal rats[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(18): 7106-7111.

[9] Yabe D, Komuro R, Liang G, *et al*. Liver-specific mRNA for Insig-2 down-regulated by insulin: implications for fatty acid synthesis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(6): 3155-3160.

[10] Putral L N, Gu W, McMillan N A. RNA interference for the treatment of cancer[J]. Drug News Perspect, 2006, 19(6): 317-324.

[11] 张泳, 谷仲平, 周勇安, 等. RNAi沉默VEGF的表达及其治疗肺癌的初步研究[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2009, 25(4): 341-343, 347.

[12] 简从相, 熊剑, 李鹏, 等. RNAi沉默IBP基因表达对乳腺癌细胞的抑制作用[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(21): 2277-2280.

(**收稿**:2011-01-04;**修回**:2011-01-29)

(编辑 吴培红)