论著

文章编号:1000-5404(2014)07-0682-05

Cbfβ人工miRNA干扰载体构建及稳定细胞株系的获得与鉴定

黄 科[1],胡宗凯[1],喻胜鹏[1],傅景曙[1],李 伟[1],董世武[2],谢 肇[1] (400038 重庆,第三军医大学:西南医院骨科,国家地方联合工程实验室,全军矫形外科中心[1],生物工程学院生物医学材料学教研室[2])

[摘要] **目的** 构建Cbfβ基因干扰载体,获得Cbfβ人工miRNA干扰载体和稳定细胞株系,检测其对间充质干细胞C3H10T1/2细胞成骨分化的影响。**方法** 设计特异性干扰小鼠Cbfβ基因的人工miRNA序列,构建Cbfβ干扰载体Blockit miRNA-cbfβ-miRNA1/miRNA2,将其转入C3H10T1/2细胞获得稳定细胞株;用BMP-2诱导3 d后采用荧光定量PCR(qRT-PCR)和Western印迹检测Cbfβ、Runx2和成骨标志基因ALP表达水平。**结果** 成功构建成骨转录因子Cbfβ的干扰载体并获得了稳定细胞株系,成骨标志基因ALP和Cbfβ的mRNA和蛋白表达水平明显下降($P<0.05$),而Runx2下降不显著($P>0.05$)。**结论** miRNA-cbfβ-miRNA1/miRNA2载体可以抑制成骨转录因子Cbfβ的功能,进而降低成骨标志基因ALP蛋白和mRNA的表达,并获得可以影响成骨过程的稳定细胞株系。

[关键词] Cbfβ;amiRNAs;amir-Cbfβ;间充质干细胞;成骨分化

[中图法分类号] R394-33; R394.2 [文献标志码] A

Construction of artificial microRNA vector interfering mouse Cbfβ gene and establishment and identification of stable cell line

Huang Ke[1], Hu Zongkai[1], Yu Shengpeng[1], Fu Jingshu[1], Li Wei[1], Dong Shiwu[2], Xie Zhao[1] ([1]Department of Orthopedics, National & Regional United Engineering Laboratory of Tissue Engineering, Center of Orthopaedics, Southwest Hospital, [2]Department of Biomedical Materials Science, School of Biomedical Engineering, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To construct and identify miRNA expression vectors interfering mouse core binding factor β subunit (Cbfβ) gene and to determine their effects on osteogenic differentiation of mesenchymal stem cell C3H10T1/2. **Methods** Artificial microRNA sequences specifically interfering mouse Cbfβ gene were designed and Blockit miRNA-Cbf-β-miRNA1/miRNA2 vectors interfering mouse Cbfβ gene were constructed. The vectors were transferred into C3H10T1/2 cells to get stable cell line. Quantitative RT-PCR and Western blotting were used to detect the expression levels of Cbfβ, Runt-related transcription factor 2 (Runx2) and osteogenesis marker gene alkaline phosphatase (ALP) in the cells in 3 d after BMP-2 treatment. **Results** Artificial microRNA vectors interfering Cbfβ were successfully constructed and stable cell line was obtained. The expression level of ALP and Cbfβ were obviously reduced ($P<0.05$), while Runx2 expression was not notably decreased ($P>0.05$). **Conclusion** miRNA expression vectors miRNA-Cbf-β-miRNA1/miRNA2 targeting Cbfβ gene may inhibit function of osteogenic transcription factor Cbfβ and then decrease protein and mRNA expression of ALP. Stable cell line with influenced osteogenic ability is obtained.

[**Key words**] core binding factor β subunit; artificial miRNA; amir-Cbfβ; mesenchymal stem cells; osteoblastic differentiation

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (30973065) and the Open Fund of State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury (SKLKF201313). Corresponding author: Xie Zhao, E-mail: xiezhao54981@163.com

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30973065);创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室开放基金(SKLKF201313)

[通信作者] 谢 肇,E-mail: xiezhao54981@163.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140126.1055.018.html(2014-01-26)

Cbfβ是核心结合因子(core binding factor, CBF)的一个亚基,与成骨细胞分化及骨生成有着非常密切的关系。虽然Cbfβ不与DNA结合,但在体外实验能提高Runx2(Runt-related transcription factor 2)与DNA

的结合力进而促进骨形成[1-2]。研究表明,Runx2 是通过 runt 结构域介导与 Cbfβ 结合形成的异二聚体[3],其转录活性是单独 Runx2 的 5~6 倍[1]。人工 miRNA(artificial microRNA,amiRNA)技术最早应用于哺乳动物细胞系[4],并能在活体细胞内高效表达,具有高度特异性,其表达可有效干扰外源性的和一个或多个内源性的靶基因的表达[5]。microRNAs(miRNAs)是通过完全或近似完全的碱基配对而导致靶 mRNA 的分裂和破坏[6],而 amiRNAs 通过修饰内源性 miRNA 前体来定位目的基因,这已被证明可用于下调哺乳动物里的基因表达[7-10]。本实验前期通过对成骨转录因子 Cbfβ 和间充质干细胞(mesenchymal stem cells,MSCs)成骨分化的研究,发现 Cbfβ 在 MSCs 中高表达,推测 Cbfβ 可能是 MSCs 成骨分化过程中的重要影响因子。本研究构建了 Cbfβ 人工小 RNA(artificial microRNA Cbfβ,amir-Cbfβ)干扰载体并转染 C3H10T1/2(来源于小鼠胚胎细胞)细胞,观察 Cbfβ、Runx2 和成骨标志性基因碱性磷酸酶(alkaline phosphatase,ALP)的 mRNA 和蛋白表达情况,为今后进一步研究 Cbfβ 和 Runx2 的结合力及其对成骨等细胞的影响奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料

C3H10T1/2 细胞(由第三军医大学生物医学材料学教研室董世武教授惠赠),DNA marker 和大肠杆菌 JM109 感受态购买于全式金公司,胎牛血清、DMEM/F12 培养基购于 HyClone 公司,转染试剂脂质体 2000(Lipofectamine 2000)、RNA 抽提试剂 Trizol 购自 Invitrogen 公司,无 RNA 酶的物品购自 Axygen 公司,DNA 连接酶购自 NEB 公司,DNA 聚合酶和实时定量 PCR(real-time PCR)试剂盒购于 TaKaRa 公司,PCR 引物和 dsDNA 由上海英俊公司合成,质粒提取试剂盒、切胶回收试剂盒购自 Omega 公司,逆转录试剂盒购买于 Ferentas 公司,MTT、稻瘟菌素(Blasticidin)和 DMSO 购于 Sigma 公司,用于 Western blot 的兔抗鼠 Cbfβ、Runx2 和 ALP 抗体购于 Santa 公司,二抗(羊抗兔)、兔抗鼠内参 β-actin 购于康为世纪公司。

1.2 amir-Cbfβ 质粒表达载体的构建

1.2.1 质粒的构建、转化和纯化 ①Cbfβ miRNA 干扰质粒载体的构建:依据小鼠 Cbfβ(NM_022309.4)的基因信息,设计并合成 2 对人工 miRNA 序列,序列见表 1。②载体连接:按照载体构建试剂盒 BLOCKIT™ Pol Ⅱ miR RNAi Expression Vector Kit 提供的方法,分别将 2 对 oligo 单链退火合成双链,然后进行重组克隆,将 2 对双链的 miRNA oligo 分别插入 miRNA 表达载体 pcDNA6.2-G/W-EmGFP-miR 中,构建 Cbfβ-miRNA1 及 Cbfβ-miRNA2 表达质粒,具体操作见试剂盒说明。③质粒转化和筛选:取 2 μL 连接物加入 200 μL 感受态细菌,轻轻混匀,冰上放置 5~30 min;42 ℃ 60 s,立即于冰上放置 1~2 min;加入 250 μL SOC 培养基,37 ℃ 200 r/min 缓慢摇菌 1 h;涂布连接产物到含有 50 μg/mL 壮观霉素的 LB 平板,37 ℃倒置培养皿培养过夜;每个转化平板分别挑取 3 个克隆进行测序,以验证重组克隆中插入片段序列是否与设计的 oligo 序列一致。筛选出插入片段正确的阳性克隆即为构建成功的质粒载体。④质粒的纯化:质粒纯化试剂盒进行质粒纯化。

表 1 Cbfβ 人工 miRNA amiRNA Cbfβ-1 及 amiRNAβ-2 设计序列

序号	Oligo 序列
amiRNA Cbfβ-1	正义链:5′-TGCTG**ATCAATGGGAGAAATGCATCT**GTTTTG-GCCACTGACTGAC*AGATGCATCTCCCATTGAT*-3′
	反义链:5′-CCTG*ATCAATGGGAGATGCATCTG*TCAGTCAGTGGC-CAAAAC**AGATGCATTTCTCCCATTGAT**C-3′
amiRNA Cbfβ-2	正义链:5′-TGCTG**TCATAGTGCTCAGTAACACAA**GTTTTG-GCCACTGACTGAC*TTGTGTTAGAGCACTATGA*-3′
	反义链:5′-CCTG*TCATAGTGCTCTAACACAA*GTCAGTCAGTGGC-CAAAAC**TTGTGTTACTGAGCACTATGA**C-3′

加粗部分为人工 miRNA 成熟序列,斜体部分为人工 miRNA 互补序列,下划线部分为接头序列

1.2.2 Cbfβ miRNA 串联序列质粒表达载体构建 利用 *Bgl* Ⅱ 和 *Bam*H Ⅰ同尾相连的原理构建串联序列质粒表达载体。将 Cbfβ-amiRNA2 用 *Sal* Ⅰ及 *Xho* Ⅰ酶切,而 Cbfβ-amiRNA1 用 *Bgl* Ⅱ 和 *Xho* Ⅰ酶切,利用 *Bam*H Ⅰ酶与 *Bgl* Ⅱ酶为同尾酶的特性,用 T_4 连接酶将其构建到同一个载体上。酶切回收原理见图 1。

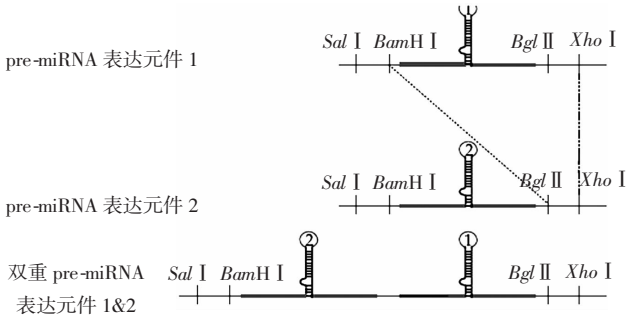


图 1 酶切回收原理图

1.3 细胞培养、稳定细胞系的筛选及诱导

C3H10T1/2 细胞(小鼠胚胎细胞)常规培养于添加 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液中,37 ℃、5% CO_2 孵箱中培养,每 2~3 天,以 1∶3 比例传代。接种 C3H10T1/2 细胞,10% 胎牛血清 DMEM/F12 培养基培养 24 h 后,按照 Lipofectamine™ 2000 试剂盒说明书进行转染。待将 amir-Cbfβ 和空载体转染细胞按照试剂盒转入细胞中,4 h 后更新鲜培养基,第 2 天更换带杀稻瘟菌素(Blasticidin,Sigma,浓度为 6 μg/mL)培养基,每隔 3~4 d 更换 1 次带抗性的培养基,14 d 后进行荧光观察,存活细胞均能发出荧光。BMP-2 为常规成骨诱导剂,本研究在培养基中加入 100 ng/mL 的 BMP-2 对其成骨过程进行诱导。在确认获得稳定的细胞株后,将携带 amir-Cbfβ 和空载体的细胞接种于 6 孔板中,待细胞融合度达 80%~90% 时,加入 100 ng/mL BMP-2 进行成骨分化诱导。72 h 后行 qRT-PCR 及 Western blot 检测。

1.4 qRT-PCR 检测 mRNA 表达

用 Trizol 提取总 RNA,使用反转录试剂盒得到 cDNA 后,定量 PCR 检测目的基因,并以 GAPDH 为内参均一模板。按照试剂盒说明书将定量试剂、待测基因引物和 1 μL 的 cDNA 模板

加到0.2 mL MicroAmp (ABI)中使最后容积为20 mL。扩增参数为94 ℃ 5 min,接着94 ℃ 30 s、57 ℃ 30 s、72 ℃ 3 s,40个循环。本实验中使用RT-PCR引物:GAPDH正义链:5′-AAATGGTGAAGGTCGGTGT-3′,反义链:5′-CCTGGAAGATGGTGATGGGG-3′,基因编号:NM_008084.2,扩增片段231 bp;Cbfβ正义链:5′-TTCGTTAAGTGGAGCACAGC-3′,反义链:5′-AGTGGGTGACGTCTTCACTG-3′,基因编号:NM_022309.4,扩增片段149 bp;Runx2正义链:5′-CCACCTCTGACTTCTGCCTC-3′,反义链:5′-ATGAAATGCTTGGGAACTGC-3′,基因编号:XM_006523547.1,扩增片段108 bp;ALP正义链:5′-GGACAGGACACACACACACA-3′,ALP反义链:5′-CAAACAGGAGAGCCACTTCA-3′,基因编号:XM_006538500.1,扩增片段77 bp。PCR扩增,循环数40个。所有的qRT-PCR反应在PCR System 7500(ABI)完成。定量数据用$2^{-\triangle\triangle Ct}$的方法分析。

1.5 Western blot检测蛋白表达

总的C3H10T1/2细胞裂解物被裂解缓冲液[50 mmol/L Tris(pH 7.6),150 mmol/L NaCl,1% Triton X-100,1%脱氧胆酸钠,0.1% SDS,1 mmol/L PMSF和0.2%抑肽酶(Sigma)]提取。检测蛋白浓度后,同等的蛋白样本被混合到2×上样本缓冲区(Beyotime)并煮沸。10% SDS-PAGE胶体分解,用半干燥的方法转移至PVDF膜(Millipore)上。之后融入5%脱脂牛奶洗涤缓冲液2 h后,加入Cbfβ一抗(1∶1 000,Santa Cruz公司)、Runx2一抗(1∶1 000,Santa Cruz公司)、ALP一抗(1∶1 000,Santa Cruz公司)和β-actin抗体(1∶100,康为世纪公司),4 ℃孵化过夜。β-actin作为内参。接着用TBST洗涤,加入带有辣根过氧化物酶的二抗(1∶10 000,Santa Cruz公司),室温孵化1 h。印迹被Femto(Pierce,IL,USA)显现。

1.6 统计学分析

实验重复3次,数据用$\bar{x} \pm s$表示,各样本取均值比较,采用SPSS 16.0统计软件进行t检验。

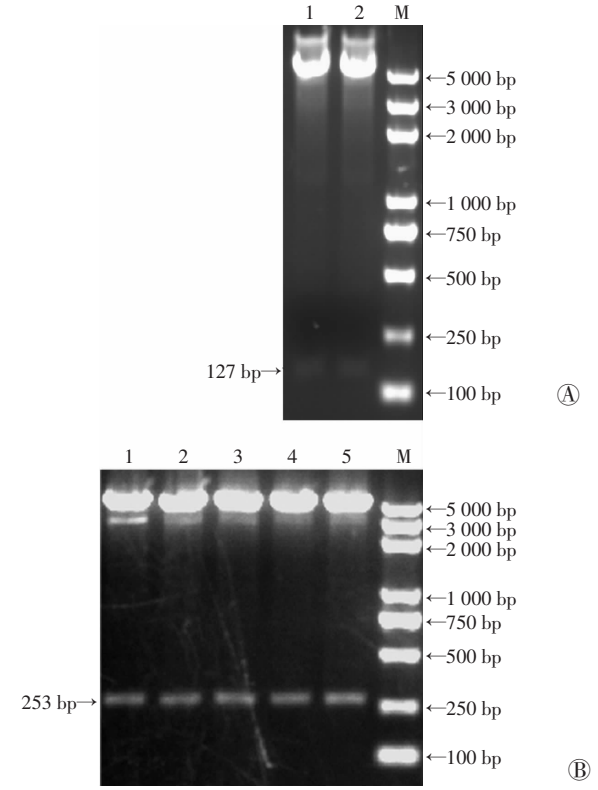
2 结果

2.1 酶切鉴定结果

amiRNA-Cbfβ两片段以*Xho* Ⅰ和*Bam*HⅠ双酶切,1%琼脂糖凝胶电泳获得127 bp左右载体片段(空载体会获得50 bp左右片段),与预期片段大小相符合(图2A)。amiRNA-Cbfβ-1/2融合载体用相同方法酶切,获得阳性为253 bp片段(图2B),将3号阳性菌落送金丝特生物技术有限公司(中国,南京)测序。

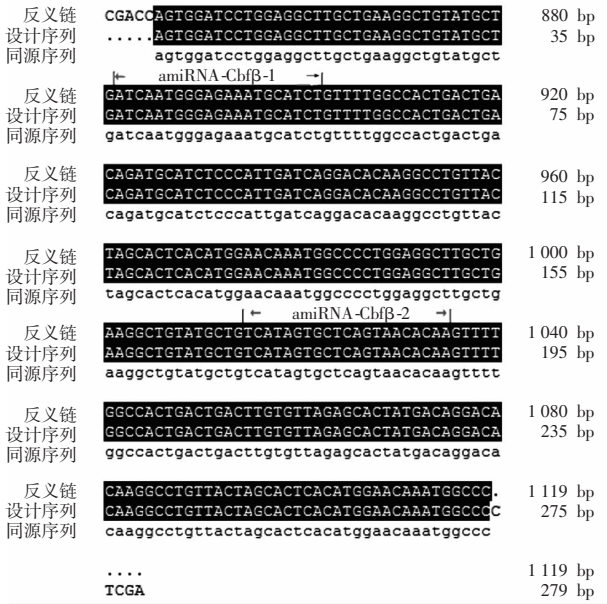
2.2 载体构建与鉴定

凝胶电流所显示的条带约为250 bp,符合目的条带大小,初步证明两片连接成功。最终设计片段:AGTGGATCCTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTG**ATCAATGGGAGAAATGCATCT**GTTTTGGCCACTGACTGACAGATGCATCTCCCATTGATCAGGACACACAAGGCCTGTTACTAGCACTCACATGGAACAAATGGCCCCTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTG**TCATAGTGCTCAGTAACACAA**GTTTTGGCCACTGACTGACTTGTGTTAGAGCACTATGACAGGACACACAAGGCCTGTTACTAGCACTCACATGGAACAAATGGCCCCTCGAG。用DNAMAN软件将反义链和设计序列进行比对得出结果符合要求(图3)。



A:Cbfβ-miRNA1和Cbfβ-miRNA2的酶切结果;1:Cbfβ-miRNA1;2:Cbfβ-miRNA2;M:全式金trans marker 2000 plus;B:Cbfβ-miRNA1/miRNA2连接载体的酶切结果;1~5:各个单菌落提取质粒;M:全式金trans marker 2000plus

图2 载体酶切结果



箭头包含的部分为amiRNA-Cbfβ-1/2的成熟序列

图3 测序结果与设计序列比对

2.3 细胞转染及荧光鉴定

转染amir-Cbfβ干扰载体的C3H10T1/2细胞通过荧光显微镜观察,可见细胞发出绿色荧光,表明细胞中有转染的外源基因表达,提示载体转染成功(图4)。

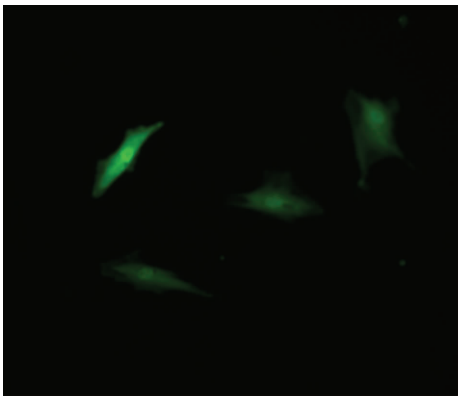


图 4 amir-Cbfβ 转染 C3H10T1/2 细胞 48 h 后绿色荧光蛋白表达（荧光显微镜 ×400）

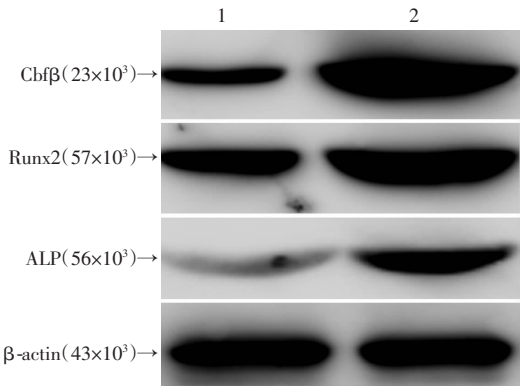
2.4 qRT-PCR 和 Western blot 检测 Cbfβ、Runx2 和 ALP 的表达

在 C3H10T1/2 细胞里转染了 amir-Cbfβ 干扰载体（实验组）及其阴性对照（对照组），BMP-2 诱导 3 d，qRT-PCR 和 Western blot 检测 2 组细胞转录物（表 2，图 5），结果显示实验组与对照组相比，Runx2 的表达略有降低，而 Cbfβ 和 ALP 的表达降低明显（$P<0.05$）。

表 2 qRT-PCR 检测 Cbfβ、Runx2 和 ALP 表达（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

组别	Cbfβ	Runx2	ALP
对照组	1.00 ± 0.01	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.08
实验组	0.48 ± 0.09[a]	0.86 ± 0.05	0.18 ± 0.03[a]

a：$P<0.05$，与对照组比较



1：转染 amir-Cbfβ 干扰载体；2：阴性对照

图 5 Western blot 检测 Cbfβ、ALP 和 Runx2 表达

3 讨论

骨髓来源的 MSCs 是一类具有高度自我更新和多向分化潜能的成体干细胞[11]，可在体外特定的条件下诱导分化为骨、软骨、脂肪等组织。MSCs 具有来源广泛、取材方便、生长稳定、增殖快、定向分化能力强、易于接种成活等优点，所以被广泛应用于基础和临床研究，也被认为是骨组织工程中最佳的种子细胞。碱性磷酸酶 ALP 广泛存在于机体各组织器官中，主要是肝、肾、胎盘、小肠和骨。人体血清 ALP 几乎有 50% 是由成骨细胞合成，也称骨源性碱性磷酸酶。ALP 是用来评价成骨细胞分泌功能最常见的指标之一，是成骨细胞分泌的一种酶蛋白，也是成骨细胞分化的特异性指标。所以，MSCs 成骨分化过程中 ALP 的检测对成骨的研究有重要意义。

Cbfβ 是非 DNA 结合的 CBF 复合体的亚基，长约 50 kb，定位于人类 16 号染色体的 16q22 上，有 6 个外显子[1]。虽然 Cbfβ 调节成骨的机制仍然在研究，但是由于它缺失后导致鼠出生后即刻死亡[2]，限制了研究的进展，这也成为今研究的重点、难点之一。

RNA 干扰（RNA interference，RNAi）技术是通过降解互补 mRNA 的一种方法，其机制是被同源的 siRNA 有效地双重诱导和特定序列转录后抑制基因表达[12-13]，即转录后导致基因沉默的细胞处理[14-15]。该技术可以有效地在癌基因的治疗中起作用[16-18]。RNAi 技术包括合成的 siRNAs 和 amiRNAs；amiRNA 是利用天然 miRNAs 前体框架靶向特定序列上目的基因的技术[19-20]，并已成功用于基因治疗研究[9]。与 shRNA 或 siRNA 比较，amiRNA 有调节表达的优势，表现为动物模型体内处理更高效和更安全[21-22]。我们利用 RNAi 原理，构建了 amir-Cbfβ 干扰载体，并通过酶切和测序的验证，符合实验设计。然后将其成功地转入具有成骨分化能力的小鼠胚胎细胞 C3H10T1/2 细胞中，并通过抗性筛选形成了稳定细胞株。通过转染 amir-Cbfβ 干扰载体（实验组）和空载体（对照组）后用成骨细胞诱导剂 BMP-2 诱导 3 d，分别检测 2 组细胞中 Cbfβ、Runx2 和 ALP 的 mRNA 及蛋白的表达，结果显示实验组的 Cbfβ、ALP mRNA 和蛋白的表达相比对照组明显降低，而 Runx2 降低不显著。所得结果充分说明在 MSCs 成骨分化过程中，amir-Cbfβ 干扰载体明显抑制了 Cbfβ 的表达，进而显著降低成骨标志基因 ALP 的 mRNA 和蛋白表达，并通过抗性筛选成功获得稳定的 C3H10T1/2 细胞株系，但是 Runx2 蛋白和 mRNA 的表达降低不显著，在后续研究中可以通过对 Runx2 进行 Chip-qPCR（基因组免疫共沉淀-定量 PCR）的检测确定 Runx2 在缺少 Cbfβ 的条件下对下游成骨关键基因的启动子结合力强弱，为阐明其在成骨过程中的作用打下基础。

参考文献：

[1] Ogawa E, Inuzuka M, Maruyama M, *et al*. Molecular cloning and characterization of PEBP2 beta, the heterodimeric partner of a novel Drosophila runt-related DNA binding protein PEBP2 alpha[J]. Virology, 1993, 194(1): 314-331.

[2] Yoshida C A, Furuichi T, Fujita T, *et al*. Core-binding factor beta interacts with Runx2 and is required for skeletal development[J]. Nat Genet, 2002, 32(4): 633-638.

[3] Lien C Y, Lee O K, Su Y. Cbfb enhances the osteogenic differentiation of both human and mouse mesenchymal stem cells induced by Cbfa-1 *via* reducing its ubiquitination-mediated degradation[J]. Stem

Cells, 2007, 25(6): 1462 – 1468.
[4] Zeng Y, Wagner E J, Cullen B R. Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells[J]. Mol Cell, 2002, 9(6): 1327 – 1333.
[5] Warthmann N, Ossowski S, Schwab R, *et al*. Artificial microRNAs for specific gene silencing in rice[J]. Methods Mol Biol,2013,956:131 – 149.
[6] Moxon S, Jing R, Szittya G, *et al*. Deep sequencing of tomato short RNAs identifies microRNAs targeting genes involved in fruit ripening [J]. Genome Res, 2008, 18(10): 1602 – 1609.
[7] Baek M N, Jung K H, Halder D, *et al*. Artificial microRNA-based neurokinin-1 receptor gene silencing reduces alcohol consumption in mice[J]. Neurosci Lett, 2010, 475(3): 124 – 128.
[8] Hu T, Chen P, Fu Q, *et al*. Comparative studies of various artificial microRNA expression vectors for RNAi in mammalian cells[J]. Mol Biotechnol, 2010, 46(1): 34 – 40.
[9] Huang X, Jia Z. Construction of HCC-targeting artificial miRNAs using natural miRNA precursors[J]. Exp Ther Med, 2013, 6(1): 209 – 215.
[10] Xiao S, Wang Q, Gao J, *et al*. Inhibition of highly pathogenic PRRSV replication in MARC-145 cells by artificial microRNAs[J]. Virol J, 2011, 8: 491.
[11] Jackson W M, Nesti L J, Tuan R S. Concise review: clinical translation of wound healing therapies based on mesenchymal stem cells [J]. Stem Cells Transl Med, 2012, 1(1): 44 – 50.
[12] Cogoni C, Romano N, Macino G. Suppression of gene expression by homologous transgenes[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 1994, 65 (3): 205 – 209.
[13] Sharp P A, Zamore P D. Molecular biology. RNA interference[J]. Science, 2000, 287(5462): 2431 – 2433.
[14] Huntzinger E, Izaurralde E. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay[J]. Nat Rev Genet, 2011, 12(2): 99 – 110.
[15] Kawamata T, Tomari Y. Making RISC[J]. Trends Biochem Sci, 2010, 35(7): 368 – 376.
[16] Yao N, Yao D, Wang L, *et al*. Inhibition of autocrine IGF-Ⅱ on effect of human HepG2 cell proliferation and angiogenesis factor expression[J]. Tumour Biol, 2012, 33(5): 1767 – 1776.
[17] Ibrahim A F, Weirauch U, Thomas M, *et al*. MicroRNA replacement therapy for miR-145 and miR-33a is efficacious in a model of colon carcinoma[J]. Cancer Res, 2011, 71(15): 5214 – 5224.
[18] Shi Z M, Wang J, Yan Z, *et al*. MiR-128 inhibits tumor growth and angiogenesis by targeting p70S6K1[J]. PLoS One, 2012, 7(3): e32709.
[19] Fellmann C, Lowe S W. Stable RNA interference rules for silencing [J]. Nat Cell Biol, 2014, 16(1): 10 – 18.
[20] Sibley C R, Seow Y, Wood M J. Novel RNA-based strategies for therapeutic gene silencing[J]. Mol Ther, 2010, 18(3): 466 – 476.
[21] Boudreau R L, Martins I, Davidson B L. Artificial microRNAs as siRNA shuttles: improved safety as compared to shRNAs *in vitro* and *in vivo*[J]. Mol Ther, 2009, 17(1): 169 – 175.
[22] Liu X, Fang H, Chen H, *et al*. An artificial miRNA against HPSE suppresses melanoma invasion properties, correlating with a down-regulation of chemokines and MAPK phosphorylation[J]. PLoS One, 2012, 7(6): e38659.

(**收稿**:2013-12-30;**修回**:2014-01-17)
(编辑 龙 亮)

(上接681页)

可进一步损害机体的免疫功能,而免疫功能的低下又易导致感染或感染不易控制。由此可见,感染性发热为糖尿病患者主要的发热原因。本例患者入院时有明确的排尿疼痛症状,查尿常规:镜下白细胞40以上/HP,血常规示:WBC 17.5×10^9/L,GR 88.5%,静滴喹诺酮类药物有效,尿路感染不难诊断。抗生素升级后尿路刺激症状很快消失,中段尿细菌培养未检出致病菌,多次血培养结果均为阴性,患者其它症状仍无明显改善,考虑可能存在非感染因素,结合进一步相关检查作出诊断。

早期明确诊断是治疗本病的关键。成人Still病临床表现复杂多样,症状不典型,缺乏特异诊断指标和统一的诊断标准,需反复检查排除感染性疾病、肿瘤及其他结缔组织疾病,此过程易导致过度检查和卫生资源的浪费。近30年来,不同的诊断标准相继提出,但临床上仍无法避免误诊和漏诊的发生,经过临床验证,仍以1992年日本Yamaguchi标准[1]作为主要诊断指标,具有较高的特异度和敏感度。2002年Fautrel等[2]提出一种新的诊断标准,无需进行排除诊断,敏感性达80.6%,特异性达98.5%。临床上诊断不明原因发热的患者时,Yamaguchi诊断标准可作为成人Still病的筛选标准,在满足Yamaguchi标准的基础上,如果血清铁蛋白在1 250 μg/L以上,则诊断特异性高达99.2%。

糖尿病合并成人Still患者应用糖皮质激素时需密切注意血糖变化。糖皮质激素是目前治疗AOSD的主要药物,约80%的患者需应用糖皮质激素治疗,据报道激素治疗有效率可达76%~95%[3]。糖皮质激素可使肝脏和周围组织对胰岛素敏感性下降,肝糖输出增多,减少肌肉和脂肪组织对葡萄糖的摄取,使糖尿病患者的胰岛素用量显著增加。本例患者入院前应用预混胰岛素控制血糖,入院时查随机指尖血糖HI,糖化血红蛋白10.4%,开始接受胰岛素泵治疗,很快血糖控制达标。应用大剂量糖皮质激素治疗后,午餐后及晚餐后血糖显著升高。这与清晨1次口服中效激素制剂有关。甲基泼尼松龙用药4~8 h作用最强,故午餐血糖升高,晚餐后最明显,夜间和清晨自然下降(因较大剂量激素治疗10~14 d,患者内源性皮质醇分泌被完全抑制,早晨4:00~10:00时,身体内、外源性皮质醇浓度均很低)[4],提示我们应注意患者夜间低血糖的问题。在下泵后我们采用晚睡前皮下注射甘精胰岛素配合三餐前皮注门冬胰岛素的治疗方案,灵活控制血糖,同时有效避免了低血糖的风险。

参考文献:

[1] Yamaguchi M, Ohta A, Tsunematsu T, *et al*. Preliminary criteria for classification of adult onset Still's disease[J]. J Rheumatol, 1992, 19 (3): 424 – 430.
[2] Fautrel B, Zing E, Golmard J L, *et al*. Proposal for a new set of classification criteria for adult-onset Still disease[J]. Medicine (Baltimore), 2002, 81(3): 194 – 200.
[3] Ishaq M, Nazir L, Riaz A, *et al*. 'The eyes see what the mind knows.' Adult-onset Still's disease[J]. Int J Rheum Dis, 2012, 15 (5): e96 – e100.
[4] 傅淑霞, 张春霞, 闫喆, 等. 肾脏病患者糖皮质激素致高血糖的特点及瑞格列奈的疗效[J]. 中国糖尿病杂志, 2010, 18(12): 925 – 929.

(**收稿**:2013-12-24;**修回**:2014-02-18)
(编辑 邓强庭)