技术与方法 文章编号:0253-3626(2010)11-1676-04

人脂联素基因重组腺病毒的构建与鉴定

李丙蓉,郑宏庭,邓华聪,郑 丹,刘金波,兰丽珍,程 伟
(重庆医科大学附属第一医院内分泌科,重庆 400016)

【摘 要】目的:构建含有人脂联素基因 apM1 的重组腺病毒载体,制备能表达人脂联素蛋白的重组腺病毒,为脂联素用于体内外干预动脉粥样硬化奠定基础。方法:自质粒 pGEM-T-apM1 上扩增两端带有 *Sal* Ⅰ 和 *Hind* Ⅲ 酶切位点的全长 apM1 基因,将 PCR 产物和穿梭质粒 pShuttle-CMV 经 *Sal* Ⅰ 和 *Hind* Ⅲ 双酶切后,连接、转化、筛选,进行 PCR 鉴定后送双向测序。将鉴定正确的重组质粒 pShuttle-CMV-apM1 用 *Pme* Ⅰ 酶切使其线性化后与腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 共转 BJ5183 菌,进行细菌内同源重组,筛选、鉴定、扩增,*Pac* Ⅰ 酶切后用 Lipofectamine™2000 转染低代数的 HEK293 包装细胞,进行包装出毒。结果:重组穿梭质粒 pShuttle-CMV-apM1 经 PCR 和测序鉴定正确,与腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 同源重组成功,转染 293 细胞进行包装,产生的病毒经鉴定正确,并且无具有复制能力的腺病毒存在,生物安全性高。结论:成功的制备了 apM1 基因重组腺病毒,可进一步用于脂联素干预动脉粥样硬化的研究。

【关键词】apM1 基因;腺病毒;同源重组
【中国图书分类法分类号】Q781 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-03-19

Construction and identification of recombinant adenovirus containing apM1

LI Bing-rong, et al
(*Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To construct recombinant replication-deficient adenovirus containing apM1 gene for the gene therapy research on atherosclerosis. *Methods*: The shuttle plasmid pShuttle-CMV-apM1 in which apM1 cDNA was inserted into the downstream of CMV promoter was established by DNA recombination. Then the linearized shuttle plasmid was cotransformed into colibacillus BJ5183 with adenovirus vector pAdEasy-1 to generate the recombinant replication-deficient adenovirus plasmid pAd-apM1 through homologous recombination. The linearized pAd-apM1 was transferred into HEK 293 cells with lipofectamine^{2000} for packing, and the recombinant replication-deficient adenovirus, Ad-apM1, was finally obtained. *Results*: The recombinant shuttle plasmid pShuttle-CMV-apM1 was confirmed by specific PCR and sequencing. CPE (cytopathic effect) could be observed on the eighth day after packing the linearized pAd-apM1 in HEK293 cells. The recombinant adenovirus generated had no replication capability. *Conclusion*: The replication-deficient recombinant adenovirus containing apM1 gene was successfully constructed, which can be further studied for gene therapy.

【Key words】apM1 gene; Adenovirus; Homogenous recombination

大量研究表明,在肥胖、2 型糖尿病、心血管疾病的患者中脂联素水平显著降低[1],低脂联素血症与动脉粥样硬化闭塞症和缺血性心脏病显著相关[2,3]。有心血管病变的糖尿病病人的血浆脂联素水平低于没有心血管病变者[4],糖尿病病人下降的脂联素可能是大血管病变的信号。因此,为了进一步证实升高血清中的脂联素能否在体内干预动脉粥样硬化,本研究选用人脂联素基因 apM1 为动脉粥样硬化基因治疗的目的基因,构建和制备人脂联素基因重组腺病毒,为糖尿病动脉粥样硬化的基因治疗奠定基础。

作者介绍:李丙蓉(1977-),女,博士,研究方向:糖尿病血管并发症的防治;骨质疏松的发病机制及防治;甲状腺疾病的防治。现工作单位:四川省第四人民医院。
通讯作者:邓华聪,女,教授,E-mail:deng_huacong@yahoo.com.cn。
基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:30370670,30070356);教育部基金资助项目(编号:2-04-1-5-5012);重庆市科委基金资助项目(编号:03-43-7);重庆市卫生局基金资助项目(编号:01-2-038)。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和细胞 pGEM T-apM1 质粒由本课题组构建,测序鉴定正确;pShuttle-CMV 穿梭质粒、腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 购自 Stratagene 公司;低代数的 HEK293 包装细

胞购自中国科学院上海细胞生物学研究所。

1.1.2 细菌 BJ5183 菌购自 Stratagene 公司，DH5α 由第三军医大学国家重点实验室野战外科研究所分子生物学中心保存。

1.1.3 主要试剂 限制性核酸内切酶 *Sal* Ⅰ、*Hind*Ⅲ和 T4 DNA 连接酶(New England Biolabs)；限制性内切酶 *Pme* Ⅰ、*Pac* Ⅰ(Stratagene，美国)；DNA marker(Takara)；引物合成(Takara)；DNA 聚合酶、胶回收试剂盒、质粒抽提试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒(QIAGEN)；序列分析(上海鼎安生物科技有限公司)；高糖 DMEM 培养基、PRMI1640 培养基、胎牛血清、Opti-MEM I(Gibco)；Lipofectamine™2000(Invitrogen)。

1.2 方法

1.2.1 PCR 扩增 apM1 基因 根据 GenBank 中 apM1 基因序列(NM_004797)，设计引物扩增 apM1 开放读码框序列，上、下游引物分别引入 *Sal* Ⅰ和 *Hind*Ⅲ酶切位点：上游引物 P1：cgcgtcgacatgctgttgctgggagctg；下游引物 P2：ccaagctttcagttggtgtcatggtag；以质粒 pGEM T-apM1 为模板进行 PCR 反应，取 5 μl PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳分析，纯化 PCR 产物。

1.2.2 重组质粒 pShuttle-CMV-apM1 的构建和鉴定 将 PCR 产物和 pShuttle-CMV 穿梭质粒经 *Sal* Ⅰ和 *Hind*Ⅲ双酶切后的产物进行连接，连接产物加 100 μl DH5α 感受态细胞，进行转化；挑 4 个菌落，悬于 50 μl ddH_2O 中，作为模板进行 PCR 鉴定；PCR 引物序列如下：P1：ATGCTGTTGCTGGGAGCTGTTCTACTGC；P2：TCAGTTGGTGTCATGGTAGAGAA-GAAAG。PCR 反应体系如下：菌落模板 1 μl+10×PCR 反应 Buffer 5 μl+10 mmol/L dNTP1 μl+10 μmol/L P1 1 μl+10 μmol/L P2 1 μl+Taq 酶 5U 补充 ddH_2O 至反应体积 50 μl；按以下程序进行 PCR：第 1 步 98℃，5 min；第 2 步 94℃，30 s；第 3 步 56℃，30 s；第 4 步 72℃，90 s；第 5 步重复第 2 步，30 循环；第 6 步 72℃，6 min；取 5 μl PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳分析。取 PCR 鉴定为阳性的克隆，送双向测序，鉴定插入 apM1 基因的序列。

1.2.3 重组腺病毒载体 pAd-apM1 的构建和鉴定 重组穿梭质粒 pShuttle-CMV-apM1 用 *Pme* Ⅰ酶切使其线性化，酶切反应体系如下：pShuttle-CMV-apM15 μg+10×Buffer4 5 μl+100×BSA0.5 μl+*Pme* Ⅰ1 μl 补充 ddH_2O 至反应体积 50 μl；37℃，1 h；胶纯化试剂盒纯化酶切产物，洗脱于 30 μl ddH_2O 中；线性化穿梭质粒 pShuttle-CMV-apM1 与腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 共转 BJ5183 菌、PCR 鉴定，取 5 μl PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳分析。

1.2.4 *Pme* Ⅰ酶切重组腺病毒载体 pAd-apM1 酶切反应体系 *Pme* Ⅰ1 μl+pAd-apM110 μg+10×Buffer2 10 μl+100×BSA1 μl 补充 ddH_2O 至反应体积 50 μl；37℃，2 h；取 1 μl 电泳鉴定酶切效率，其余样品 -20℃保存待用。

1.2.5 重组腺病毒载体转染 HEK293 细胞进行包装 转染前 4 h 将 25 cm^2 培养瓶的培养液吸弃，换用 5 ml 的 DMEM 无血清培养基培养；酶切纯化的重组腺病毒载体 pAd-apM1 加 500 μl Opti-MEMI，混匀，室温放置 5 min；将 20 μl 脂质体 LF^{2000} 加入到另一含 500 μl Opti-MEMI 该管中充分混匀，室温 5 min；将 500 μl LF^{2000}/Opti-MEMI Ⅰ混合液加入到 500 μl pAd-apM1/Opti-MEMI 混合液中，充分混匀，室温放置 20 min；设置 3 组对照：①空白对照(不加腺病毒载体)：500 μl LF^{2000}/Opti-MEMI Ⅰ混合液加入到 500 μl Opti-MEMI 混合液中，充分混匀，室温放置 20 min；②pAd-LacZ 对照(加入对照腺病毒载体)：500 μl LF^{2000}/Opti-MEMI Ⅰ混合液加入到 500 μl pAd-LacZ/Opti-MEMI 混合液中，充分混匀，室温放置 20 min；正常对照(不加转染试剂)：500 μl Opti-MEMI Ⅰ培养液加入到 500 μl Opti-MEMI 培养液中，充分混匀，室温放置 20 min；将 25 cm^2 培养瓶中的无血清培养液吸弃；将 1 ml 上述混合物加入到铺满 HEK293 细胞 25 cm^2 培养瓶中，轻晃培养瓶，使之均匀的覆盖在 HEK293 细胞层上；将转染的 25 cm^2 培养瓶置于 5%CO_2、37℃湿度孵箱中培养 2 h；加 5 ml DMEM 无血清培养液，5%CO_2、37℃，继续培养 24 h；转染细胞重悬后以 70%的密度接种继续培养。

1.2.6 重组腺病毒 Ad-apM1 的产生、鉴定和扩增，用 50%组织培养感染量 $TCID_{50}$ 法测定病毒滴度 将转染的 HEK293 细胞与新鲜 HEK293 细胞悬浮后按 3:1 比例混合后平均滴铺加在 3 块 24 孔板中培养，7～15 d 后观察到有病毒扩增与细胞死亡情况，选择病毒增殖(细胞死亡)有 10 孔以上的培养板作为观察对象，从中选择 10 管细胞死亡发生在 8 d 之后的样孔。反复冻融 6 次破碎细胞，5 000 r/min 离心 5 min，上清保存于 -80 ℃。取 10 μl 病毒上清液，煮沸烈解，以此为模板进行 PCR 鉴定，取 5 μl PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳分析，有目的条带表明产生的重组腺病毒包含目的基因 apM1；病毒滴度测定采用 50%组织培养感染量 $TCID_{50}$ 法计算，按照 Karber，s 公式：$TCID_{50}$= 第一排稀释度 × 稀释度$^{\Sigma-0.5}$，Σ= "出现病态反应孔的数目/每个稀释度的标本数"的总和，原始病毒滴度(pfu/ml)为：$TCID_{50}$×1 ml/0.05 ml。

2 结 果

2.1 PCR 扩增 apM1 基因

含有全长人脂联素基因 apM1 的质粒 pGEM-T-apM1 的测序结果显示与 GenBank 报导的 apM1(GI:871886)基因序列一致。自质粒 pGEM-T-apM1 上成功扩增出 750 bp 的全长人脂联素基因 apM1，1%琼脂糖凝胶电泳结果如图 1。

2.2 扩增的 PCR 产物进行 *Sal* Ⅰ和 *Hind*Ⅲ双酶切

扩增的 PCR 产物进行 *Sal* Ⅰ和 *Hind*Ⅲ双酶切后，可获得 750 bp 左右的片断，与理论值相符，1%琼脂糖凝胶电泳结果如图 2。

2.3 穿梭质粒 pShuttle-CMV 经 *Sal* Ⅰ和 *Hind*Ⅲ双酶切

穿梭质粒 pShuttle-CMV 经 *Sal* Ⅰ和 *Hind*Ⅲ双酶切后，获得了大小约为 7.5 kb 左右的线性片断。0.8%琼脂糖凝胶电泳结果如图 3。

2.4 PCR 鉴定重组穿梭质粒 pShuttle-CMV-apM1

用 apM1 引物对随机挑选的 4 个转化子进行 PCR 鉴定，经 1%琼脂糖凝胶电泳检测，由电泳图(图 4)可以看到，4 个转化子均扩增获得约 750 bp 条带，显示 4 个转化子全为接入

目的基因的重组质粒 pShuttle-CMV-apM1。

2.5 双向测序鉴定重组穿梭质粒 pShuttle-CMV-apM1

将 PCR 鉴定为阳性的克隆送双向测序，测序结果显示重组穿梭质粒成功插入了目的基因 apM1，基因序列：159 位碱基：a→g（无义突变）；558 位碱基：t→c（无义突变）。其余碱基与 GenBank 的 apM1 基因序列（gi:871886）一致，同源性为 99.7%。

2.6 穿梭质粒 pShuttle-CMV-apM1 经 *Pme* Ⅰ酶切线性化

含有目的基因 apM1 的穿梭质粒 pShuttle-CMV-apM1 经 *Pme* Ⅰ酶切线性化后，0.8%的凝胶电泳显示获得了约 8.2kb 左右的线性片断（图 5），与理论值相符，证明酶切完全。

2.7 重组腺病毒载体 pAd-apM1 的鉴定

挑 6 个菌落较小的克隆抽提 DNA，经 0.7%琼脂糖凝胶电泳检测，2、5、6、7 号克隆大小约 40 kb，显示其为同源重组成功的重组体；3、4 号克隆的分子量 <10 kb，显示其同源重组不成功，为阴性克隆，结果见图 6。对 2、5、6、7 号阳性克隆进一步行 PCR 鉴定，经 1%琼脂糖凝胶电泳检测，由电泳图可以看到，4 个克隆都扩增获得约 750 bp 条带，显示这 4 个克隆为接入目的基因的重组腺病毒 pAd-apM1，结果见图 7。我们通过细菌同源重组法成功的构建了含有目的基因 apM1 的重组腺病毒载体 pAd-apM1。

2.8 腺病毒 pAd-apM1 经 *Pac* Ⅰ酶切

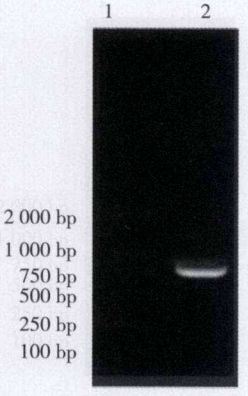
纯化后质粒经 *Pac* Ⅰ酶切，使其暴露出反向终止重复序列（ITR）。经 *Pac* Ⅰ酶切，重组质粒中可切出产生一大于 20 kb 的带和约 3.0 kb 的特征性带（图 8）。

2.9 重组腺病毒在低代数 HEK293 细胞中的包装

生长状态良好的 HEK293 细胞见图 9A。应用脂质体转染方法，将 *Pac* Ⅰ酶切后的重组腺病毒 pAd-apM1 导入 HEK293 细胞，包装产生重组腺病毒。7～8 d 后开始出现噬斑现象（图 9B），12～15 d 时出现噬斑的孔细胞发生肿胀、漂浮、死亡（图 9C），18 d 时完成判断。人脂联素基因重组腺病毒和报告基因 LacZ 重组腺病毒在 HEK293 细胞中获得了大量扩增，经氯化铯密度梯度离心纯化后，$TCID_{50}$ 测定病毒滴度为 2×10^{11} PFU/ml。

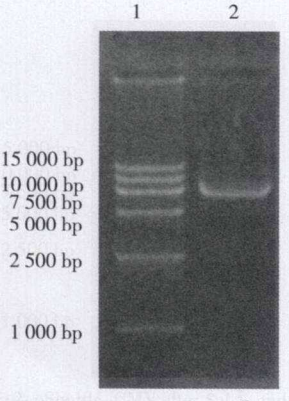
3 讨 论

血浆脂联素在 2 型糖尿病患者中明显降低，合并大血管病变患者降低更明显，提示血浆脂联素水平降低可能是发生糖尿病及糖尿病大血管病变的一个独立危险因素[5]。有研究认为，脂联素与动脉内膜中层厚度呈高度负相关[6,7]，而脂联素是阻止和延缓动脉粥样硬化发生和病变程度的重要标志因子。脂联素对心脏的缺血－再灌注损伤具有保护作用，通过激活 AMPK 途径减少心肌细胞的氧化应激和凋亡[8]。因此，脂联素在糖尿病病程中的血管保护具有潜在的治疗价值。脂联素可能是治疗胰岛素抵抗和 2 型糖尿病大血管并发症基



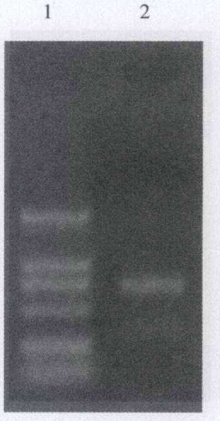
1. DNA marker（DL2000）；2. apM1 gene

图 1 自质粒 pGEM-T-apM1 上扩增全长 apM1 基因



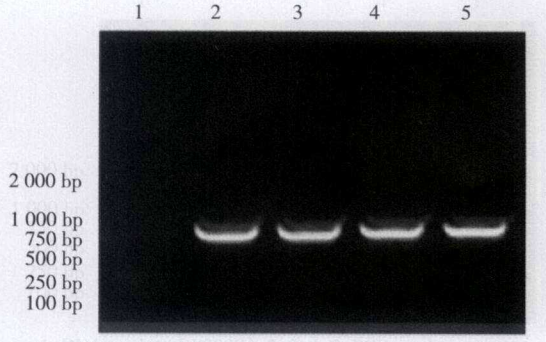
1. DNA marker；2. pShuttle-CMV after *Sal* Ⅰ and *Hind* Ⅲ digest

图 3 质粒 pShuttle-CMV 经 ***Sal*** Ⅰ 和 ***Hind*** Ⅲ 双酶切



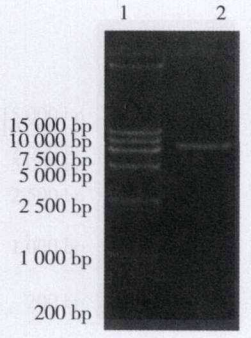
1. DNA marker（DL2000）；2. apM1 fragment after *Sal* Ⅰ and *Hind* Ⅲ digest

图 2 PCR 扩增 apM1 产物经 ***Sal*** Ⅰ 和 ***Hind*** Ⅲ 双酶切



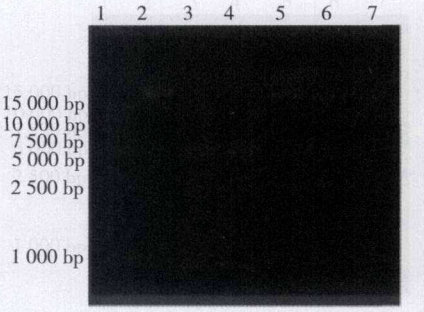
1. DNA marker（DL2000）；2、3、4、5. PCR product of positive clone which we picked up

图 4 重组质粒 pShuttle-CMV-apM1 的 PCR 鉴定电泳图



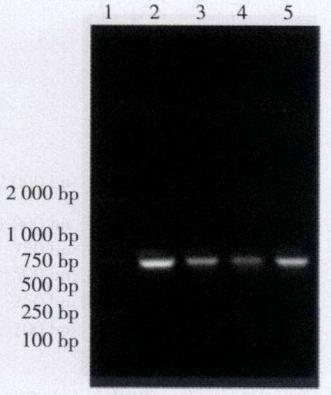
1. DNA marker; 2. pShuttle-CMV-apM1 after *Pme* Ⅰ digest

图 5 质粒 pShuttle-CMV-apM1 经 ***Pme*** Ⅰ 酶切



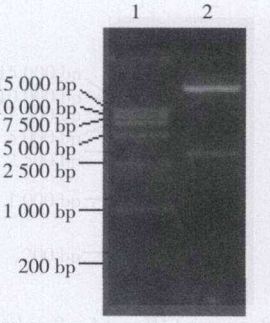
1. DNA marker; 2、5、6、7. Positive clones of recombinant adenovirus; 3、4. Negative clones of recombinant adenovirus

图 6 重组腺病毒大小鉴定



1. DNA marker; 2、3、4、5. PCR products of recombinant pAd-apM1

图 7 PCR 鉴定重组腺病毒



1. DNA marker; 2. pAd-apM1 fragment after *Pac* Ⅰ digestion

图 8 ***Pac*** Ⅰ 酶切重组腺病毒载体 pAd-apM1



A. 正常 HEK293 细胞；B. 中箭头所示为噬斑形成；C. 为漂浮、肿胀、死亡的 HEK293 细胞

图 9 腺病毒制备过程各阶段 HEK293 细胞的生长状态（×100）

因治疗的新靶点，因此本研究将人脂联素基因 apM1 作为糖尿病动脉粥样硬化的目的基因。

腺病毒载体是研究心血管系统基因治疗最常用的载体，腺病毒载体具有以下优点：宿主范围广，对人致病性低；在增殖和非增殖细胞中感染和表达基因；能有效进行增殖，滴度高；无需辅助病毒，可容纳 7.5 kb 外源 DNA；与人类基因同源；不整合到染色体中，无插入致突变性；能在悬浮培养液中扩增；能同时表达多个基因；可用于体内基因的直接转移。本实验中使用的构建重组腺病毒的 AdEasyTM 系统是由 T.C. He 构建的用来代替传统腺病毒重组系统的一个快捷系统。在本系统中，穿梭质粒 pShuttle-CMV 含有单拷贝 CMV 启动子和 polyA 位点供基础表达和高表达重组蛋白，CMV 启动子能在大多数哺乳动物细胞中高效表达蛋白。该实验研究在获得人脂联素基因克隆的基础上，自质粒 pGEM T-apM1 上扩增两端带有 *Sal* Ⅰ 和 *Hind* Ⅲ 酶切位点的 apM1 基因片断，用 *Sal* Ⅰ 和 *Hind* Ⅲ 双酶切 PCR 产物和空穿梭质粒 pShuttle-CMV 后，进行定向连接、转化，进行特异性 PCR 和双向测序鉴定，证实插入的 apM1 基因序列和方向均正确。将成功构建的重组穿梭质粒用 *Pme* Ⅰ 酶切线性化后，与腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 共转 BJ5183 菌进行同源重组。该实验中挑取的 6 个克隆中，进行腺病毒重组体的大小和 PCR 鉴定显示 4 个为阳性克隆，2 个为阴性克隆，获得了满意的结果。

腺病毒基因组两侧为逆向末端重复序列（ITR，Iaverted Termined Repeats），其中含有基因组复制和包装序列，因此，需要将得到的重组腺病毒载体用 *Pac* Ⅰ 线性化，暴露其反向末端重复序列，转染 293 细胞后产生重组病毒颗粒。转染 293 细胞时，本实验采用 invitrogen 公司著名的 DNA 转染试剂 Lipofectamine ™2000，具有高效低毒，耐血清，易于操作，适用

技术与方法 文章编号:0253-3626(2010)11-1680-04

人抑制素 M 突变体在毕赤酵母中的分泌表达研究

范守城[1],张云茹[2],刘 静[1]

(1.重庆生产力促进中心,重庆 401147;2.重庆理工大学药学与生物工程学院,重庆 400050)

【摘 要】目的:构建重组人抑瘤素 M 突变体(Recombinant human mutant oncostatin M,rhMut-OSM)毕赤酵母分泌表达菌株。方法:将人抑瘤素 M 蛋白成熟蛋白编码序列同义突变成毕赤酵母偏好密码子,同时将 100 位和 217 位 Asn 突变成 Glu,消除糖基化位点,人工合成人抑瘤素突变体基因。将基因直接连接到 pPIC9 载体信号肽识别序列之后,构建毕赤酵母真核表达载体 pPIC9-rhMut-OSM,电转化毕赤酵母菌株 GS115,用 PCR 法筛选阳性克隆,SDS-PAGE 和 Western blotting 方法筛选能够稳定、高效分泌表达 rhMut-OSM 的酵母工程菌。结果:培养液上清经 SDS-PAGE 和 Western blotting 证实获得了相对分子质量约为 22 kD 的 rhMut-OSM,实现了非糖基化表达,表达量高峰出现在诱导 72 h 后,摇瓶表达量为 400 mg/L。结论:成功构建了重组人抑瘤素突变体毕赤酵母工程菌株,能稳定、高效分泌表达 rhMut-OSM。

【关键词】抑瘤素 M;突变体;毕赤酵母;分泌表达

【中国图书分类法分类号】Q 94 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-02-21

Research on secretory expression of human mutant oncostatin M in pichia pastoris

FAN Shou-cheng, et al

(*Chongqing Productivity Council*)

【Abstract】*Objective*: To explore the method of secretory expression of recombinant human mutant oncostatin M (rhMut-OSM) in Pichia pastoris. *Methods*: First, optimize the gene of human oncostatin M (hOSM), change Asn100 and Asn217 to Glu100 and Glu217 respectively to remove N-glycosylation recognition sites. The sequence of mature rhMut-OSM gene was obtained by synthesis, the expression vector of Pichia pastoris of pPIC9-rhMut-OSM was constructed. The recombinant plasmid was transformed into Pichia

作者介绍:范守城(1978-),男,硕士,
研究方向:分子生物工程研究。

范围广的优点,仅需混合 Lipofectamine™2000 转染试剂和目的病毒载体,加入到细胞中,无需洗涤和更换培养基,使得操作程序简化。293 细胞在健康状态时呈拉网状并贴壁形成单层细胞,随着病毒的增殖,细胞变圆脱落,即出现所谓的细胞病变效应。据此,我们可以判断重组腺病毒载体在 293 细胞中的包装情况。在 293 细胞中进行大量扩增后至第 4 代腺病毒,病毒滴度为 1×10^9 PFU/ml,经氯化铯密度梯度离心纯化后,$TCID_{50}$ 测定病毒滴度为 2×10^{11} PFU/ml,已能满足本实验需要,为下一步用于糖尿病动脉粥样硬化的干预研究奠定了基础。

参 考 文 献

[1] Knobler H, Benderly M, Boyko V, et al. Adiponectin and the development of diabetes in patients with coronary artery disease and impaired fasting glucose[J].Eur J Endocrinol, 2006, 154(1): 87-92.

[2] Kawano T, Saito T, Yasu T, et al. Close association of hypoadiponectinemia with arteriosclerosis obliterans and ischemic heart disease[J]. Metabolism, 2005, 54(5): 653-656.

[3] Gustafsson S, Lind L, Söderberg S, et al. Associations of circulating adiponectin with measures of vascular function and morphology[J].J Clin Endocrinol Metab, 2010 Apr 7. [Epub ahead of print].

[4] Dunajska K, Milewicz A, Jedrzejuk D, et al. Plasma adiponectin concentration in relation to severity of coronary atherosclerosis and cardiovascular risk factors in middle-aged men[J].Endocrine, 2004, 25(3): 215-221.

[5] 赵小玲,邓国宝,刘媛莉,等.2 型糖尿病大血管病变中血浆脂联素的变化[J],广东医学,2009,30(1):71-73.

[6] 王中心,陈 涛.脂联素与足背动脉内膜中膜厚度[J].中华高血压杂志,2007,15(12):1022-1026.

[7] Dullaart R P, Kappelle P J, Dallinga-Thie G M.Carotid intima media thickness is associated with plasma adiponectin but not with the leptin: adiponectin ratio independently of metabolic syndrome[J]. Atherosclerosis, 2010 Mar 25. [Epub ahead of print].

[8] Bian Y F, Guo X X, Xiao C S.Protective effects of adiponectin against hypoxia/reoxygenation injury in neonatal rat cardiomyocytes[J].Sheng Li Xue Bao, 2010, 62(2): 149-55.

(责任编辑:冉明会)