

Raf-1 基因重组腺病毒 siRNA 载体构建及其 对大鼠心肌细胞肥大的影响

郑亚萍¹, 刘春杰²

(漯河医学高等专科学校 1. 生理教研室, 2. 药理教研室, 河南 漯河 462002)

【摘要】 目的 构建特异性抑制大鼠 Raf-1 基因的重组腺病毒载体, 并将其体外转导大鼠心肌细胞中进行功能鉴定。**方法** 合成针对大鼠 Raf-1 的靶序列及阴性对照序列, 经退火形成的 DNA 双链定向克隆到穿梭质粒 pAdTrackCMV 中获得 pAdTrack-siRaf-1 质粒, PmeI 线性化后在 BJ5183 细菌中与 pAdEasy-1 骨架质粒进行同源重组获得 pAd-siRaf-1 质粒, 后转染 HEK293 细胞, 包装获得 pAd-siRaf-1 腺病毒颗粒, 继而感染原代培养的心肌细胞, 通过 Western blot 方法检测 siRNA 对 Raf-1、NF- κ B 基因的抑制效率, 液体闪烁计数器测定³H-亮氨酸(³H]-leu)掺入率, 用 HJ2000 图像分析系统测定细胞表面积。**结果** 重组腺病毒载体经酶切、鉴定正确, 制备的病毒感染效率高, 携带 Raf-1 的病毒颗粒能够在蛋白水平有效抑制 Ang II 诱导心肌细胞 Raf-1 的表达、细胞表面积及³H]-leu 的增加并下调 Raf-1、NF- κ B 表达。**结论** 成功构建了 pAd-siRaf-1 重组腺病毒载体, 并在 HEK293 细胞中包装成重组腺病毒, 转染心肌细胞后能有效抑制 Raf-1、NF- κ B 表达, 抑制 Ang II 诱导的心肌细胞肥大。

【关键词】 Raf-1; 小干扰 RNA; 重组腺病毒载体; 心肌细胞; 大鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 04-0018-06

doi: 10. 3969. j. issn. 1671 - 7856. 2016. 04. 004

Construction and effect of recombinant adenovirus vector containing siRNA targeting Raf-1 on cardiomyocyte hypertrophy in neonatal rats

ZHENG Ya-Ping¹, LIU Chun-Jie²

(1. Department of Physiology, 2. Department of Pharmacology, Luohe Medical College, Luohe, Henan 462002, China)

【Abstract】 Objective To construct an adenovirus vector expressing small interfering RNA (siRNA) targeting to rat Raf-1 gene and identify its function in cardiomyocytes. **Methods** The siRNA containing DNA sequence targeting to Raf-1 and its negative control sequence were designed, synthesized, annealed and subcloned into adenoviral shuttle vector pAdTrack-CMV. The recombinant adenovirus vector pAd-siRaf-1 was obtained by homologous recombination with pAdTrack-siRaf-1 linearized by PmeI and pAdEasy-1 in bacteria BJ5183, then transfected into HEK293 cells to package the adenovirus. Cardiomyocytes were infected with the adenovirus pAd-siRaf-1, and the expressions of Raf-1 and NF- κ B protein were detected by Western blotting. [³H]-leu incorporation was evaluated by scintillation. The surface area of cardiomyocytes was measured using a HJ2000 image analysis system. **Results** The adenovirus vectors were verified by enzyme digestion and DNA sequencing. Compared with the Ang II group, Raf-1 and NF- κ B expression, the surface area and [³H]-leu incorporation of cardiomyocytes were significantly decreased in cardiomyocytes infected with the adenovirus pAd-siRaf-1. **Conclusions** A recombinant adenovirus vector containing rat siRaf-1 gene is successfully constructed. It can effectively reduce Raf-1 and NF- κ B expression and cardiomyocyte hypertrophy induced by Ang II.

[基金项目] 河南省教育厅青年骨干教师资助项目 (No. 2013GGJS-271)。

[通讯作者] 郑亚萍 (1976 -), 女, 硕士, 副教授, 研究方向: 循环生理学。

【Key words】 Raf-1; siRNA; Recombinant adenovirus vector; Cardiomyocytes; Rat

Raf-1 蛋白是由 raf 基因编码的蛋白产物,可通过 Raf-1 蛋白激酶磷酸化而激活,Raf-1 蛋白激酶是 RAF/NF- κ B 等信号传导途径中的重要信号分子,被激活的 Raf-1 过表达与细胞增殖、应激甚至与凋亡密切相关^[1,2],但目前 Raf-1 对心肌肥厚中的作用还存在一定的争议。研究显示 RAS/RAF/MEK/ERK 信号通路对大鼠心肌有明显的促肥厚效应,但也有报道提示抑制 RAS/RAF 激活并不能减轻心肌细胞肥大反应^[3,4]。另一方面,目前在心肌肥大细胞模型中,暂无明确研究证明 NF- κ B 与心肌细胞肥大的关系,且 RAF/NF- κ B 等信号传导途径对心肌肥大的作用也少见报道,尚需进一步研究。本研究的目的在于拟构建大鼠 Raf-1 siRNA 腺病毒载体,转染后观察其对 Raf-1 蛋白表达的影响,并通过在基因水平沉默技术研究 Raf-1 及 RAF/NF- κ B 等信号传导途径对心肌细胞肥大的影响,为探讨 Raf-1 对心肌肥厚的作用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

出生 2~3 d SD 乳鼠,由河南省实验动物中心提供,生产许可证号:SCXK(豫)2010-0002,使用许可证号:SYXK(豫)2011-0001。

1.2 材料及试剂

穿梭质粒 pAdTrackCMV 质粒、腺病毒骨架质粒 pAdeasy-1 购自 Stratagene 公司、293 细胞株购自 Invitrogen 公司、感受态大肠埃希菌 DH5a 及 BJ5183 菌种来自本实验室留存;PacI、PmeI、Kpn I 和 Bgl II 酶购自 New England Biolabs 公司,Raf-1 克隆抗体、NF- κ B 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司,^[3H]-亮氨酸(^[3H]-Leu)购于中国原子能研究院。

1.3 心肌细胞的培养及鉴定

取出生后 2 d~3 d 的 SD 乳鼠,在无菌条件下取出心室并剪碎,在 0.1% 胰酶消化后收集细胞,离心弃上清液,将所得全部细胞用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液重悬,置于二氧化碳培养箱中孵育,采用差速贴壁获得心肌细胞,免疫组化染色显示 α -横纹肌肌动蛋白阳性率。

1.4 Raf-1 基因重组腺病毒 siRNA 载体构建

1.4.1 Raf-1 siRNA 序列的设计:从 GenBank 中获得 SD 大鼠基因核苷酸序列(NM_012639.2),通过 <http://sirna.wi.mit.edu/home.php> 辅助设计出 3 条靶序列,1. siRaf-1-1 (1612 - 1630):TTCCAGATGTTCCAGCTAA;2. siRaf-1-2 (776 - 794):ATGGATTTCGAT GTC AGAC;3. siRaf-1-3 (2067 - 2085) AGTCAAAGAAGAAAGGCCT,将所选取的序列进行 Blast,未发现同源序列,另设 siRNA 阴性对照(与人类及其他哺乳动物非同源的无关序列)。人工合成针对 Raf-1 不同靶序列的 3 对及 siRNA 阴性对照序列 1 对引物,每对互补的单链模板 DNA 在正义链的 5' 端引入 Kpn I 酶切位点、在反义链的 5' 端引入 Bgl II 酶切位点,环(Loop)的序列为 5'-GCAAGAG-3'(表 1)。

1.4.2 重组腺病毒载体 pAd-Raf-1-siRNA 的构建及鉴定:合成四对寡核苷酸经 95℃ 退火后形成双链寡核苷酸,与 Kpn I 和 Bgl II 双酶切 pAdTrackCMV 质粒连接,转入大肠埃希菌 DH5a 转化,通过卡那霉素筛选并挑取单个菌落进行培养,抽提质粒后分别进行酶切鉴定和测序鉴定。用 PmeI 对 pAdTrack-siRaf-1 和阴性对照 pAdTrack-siCon 穿梭载体进行线性化,CIP 去磷酸化后,在大肠杆菌 BJ5183 中与腺病毒骨架质粒 pAdeasy-1 进行同源重组,获取 pAd-siRaf-1 及 pAd-siCon 用带有卡那霉素(50 μ g/mL)的 LB 平板进行筛选相对分子质量大于 pAdeasy-1

表 1 Raf-1 和阴性对照 siRNA 模板 DNA 序列
Tab.1 Sequences of the Raf-1 and negative control siRNA template DNA

靶位点 Target site	SiRNA 模板序列 SiRNA template sequence
siRaf-1-1	F:5'-GTACTTCCAGATGTTCCAGCTAAGCAAGAGTTAGCTGGAACATCTGGAATTTTGTG-3' R:5'-GATCCAAAAATTCCAGATGTTCCAGCTAACTCTTGCTTAGCTGGAACATCTGGA-3'
siRaf-1-2	F:5'-GTACATGGATTTCGATGTCAGACGCAAGAGGCTGACATCGAAATCCATTTTGTG-3' R:5'-GATCCAAAAATGGATTTCGATGTCAGACCTCTGCGTCTGACATCGAAATCCAT-3'
siRaf-1-3	F:5'-GTACAGTCAAAGAAGAAAGGCCTGCAAGAGAGCCCTTCTTCTTTGACTTTTGTG-3' R:5'-GATCCAAAAAGTCAAAGAAGAAAGGCCTCTCTTGACGGCCTTTCTTCTTTGACT-3'
Negative control(siCon)	F:5'-GTACTTCTCCGAACGTGTCACGTGCAAGAGACGTGACACGTTCCGAGAAATTTTGTG-3' R:5'-GATCCAAAAATTCTCCGAACGTGTCACGTCTCTTGACGTGACACGTTCCGAGAA-3'

质粒, PacI 酶切鉴定。

1.4.3 腺病毒的包装、扩增和滴度测定:重组腺病毒载体经 PacI 酶切、乙醇纯化后, Lipofectamine 2 000 转染入 293 细胞中。培养 5 d~7 d 后可见细胞出现贴壁细胞变圆, 肿胀, 即病变效应 (cytopathic effect, CPE), 待观察到 90% 以上细胞出现 CPE, 将细胞在 -70°C 和 37°C 反复冻融 3 次, $3\,000\text{ r/min}$ 离心 5 min, 收集原代病毒上清液, 经反复“感染-冻融-收集”, 扩增重组腺病毒至第四代后, 合并浓缩病毒液, 进行病毒的滴度测定, 病毒滴度 (Pfu/mL) = $10^7 \times$ 平均 GFP 阳性的细胞数/视野 (100)

1.5 心肌细胞培养、鉴定

取出生 2 d~3 d 的 SD 乳鼠, 在无菌条件下取出心室, 剪碎、0.1% 胰酶消化, 收集细胞, 离心弃上清液, 将所得全部细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液重悬, 置于二氧化碳培养箱中孵育。根据心肌细胞和成纤维细胞贴壁时间不同, 采用差速贴壁 1.5 h, 获得心肌细胞。免疫组化染色 (S-P 法) 观察 α -横纹肌肌动蛋白反应。

1.6 Western blot 检测 siRaf-1、NF- κ B 在肥大心肌细胞中的表达

胰酶消化细胞后, 以每孔 1.5×10^5 /孔的心肌细胞数接种 6 孔板, 用获得重组腺病毒按 50MOI 的量分别感染心肌细胞的同时加用 10^{-7} mol/L Ang II, 另设 Ang II 组 (单用 10^{-7} mol/L Ang II) 及空白心肌细胞组 (不加处理因素), 48 h 收集细胞后提取各组细胞的蛋白质, 电泳、转膜后加封闭液, 室温封闭 60 min; 加入稀释 1:2 000 Anti-rat Raf-1、1:500 NF- κ B 一抗孵育, 4°C 摇床过夜; 洗涤 3 次用封闭液 1:5 000 稀释辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗, 37°C 孵育 1 h; 漂洗后加显色剂, 避光显色 2 min~5 min, 条带出现, 终止反应, 以 β -actin 为内参, 进行比较。

1.7 心肌细胞大小测定

每孔 1.5×10^5 /孔的心肌细胞数接种 6 孔板, 用获得重组腺病毒按 50MOI 的量分别感染心肌细胞的同时加用 10^{-7} mol/L Ang II, 另设 Ang II 组 (单用 10^{-7} mol/L Ang II) 及空白心肌细胞组 (不加处理因素), 胰酶消化脱落细胞后用相差显微镜拍照, 每孔取 10 个视野, 每视野取 10 个细胞, 用 HJ2000 图像分析系统测定细胞表面积, 取平均值。

1.8 心肌细胞 [^3H]-Leu 掺入率测定

加药物干预的同时加入 [^3H]-Leu (3.7×10^4

Bq/孔), 培养 48 h 后用 PBS 液充分冲洗, 再将细胞收集于玻璃纤维滤膜上, 用预冷的 10% 三氯乙酸和 PBS 冲洗, 裂解液裂解细胞 30 min, 收集细胞裂解液置于含闪烁液的液闪杯中, 用液体闪烁仪测定放射性强度 (dpm)。

1.9 统计学方法

采用 SPSS 10.0 统计软件, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 描述, 组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 重组腺病毒载体的构建及鉴定

四对 siRNA 单链寡核苷酸成功退火, 合成四个双链 DNA 模板, 得到约 100 bp 的两个片段。抽提 pAdTrack-siRaf-1 和 pAdTrack-siCon 质粒后分别进行 Kpn I 和 Bgl II 双酶切鉴定, 出现约 9 000 bp 和小于 100 bp 两片段 (图 1); 将构建成功的穿梭质粒与腺病毒骨架质粒 pAdeasy-1 在 BJ5183 细菌中进行同源重组, 成功重组的腺病毒载体经 PacI 酶切后应出现一条大于 23 kb, 另一条带约为 4.3 kb (图 2), 测序鉴定明 3 个针对不同靶序列的 Raf-1 及阴性对照表达载体正确无误。

2.2 重组腺病毒的包装、扩增及滴度测定

pAd-siRaf-1 及 pAd-siCon 转染包装细胞 293 细胞, 转染 2 d 后, 倒置荧光显微镜下可观察到绿色荧光蛋白的表达, 培养细胞 10 d 后可观察到 90% 以上细胞表达绿色荧光蛋白 (图 3)。收集、重复感染 293 细胞扩增病毒后, 用 GFP 阳性细胞计数法进行滴度测定, 病毒滴度分别为 $3.8 \times 10^{10}\text{ pfu/mL}$ 和 $3.5 \times 10^{10}\text{ pfu/mL}$ 。

2.3 心肌细胞鉴定

心肌细胞形态不规则, 有多个伪足伸出; 免疫组化染色显示, α -横纹肌肌动蛋白呈阳性反应即为心肌细胞, 取 20 个视野统计心肌细胞阳性率测得心肌细胞阳性率达 96.2% (图 4、图 5)。

2.4 pAd-siRaf-1 表达重组腺病毒对 Ang II 诱导的心肌细胞表面积、[^3H]-Leu 掺入率及 Raf-1、NF- κ B 蛋白表达的影响

Ang II 组心肌细胞表面积、[^3H]-Leu 掺入率及 Raf-1、NF- κ B 蛋白表达显著高于空白对照组 (均 $P < 0.01$); siRaf-1-1~3 重组腺病毒组心肌细胞表面积、[^3H]-Leu 掺入率及 Raf-1 蛋白表达明显低于 Ang II 组 (均 $P < 0.05$); pAd-siCon 与空白对照组相比无明显差异 (图 6, 表 1)。

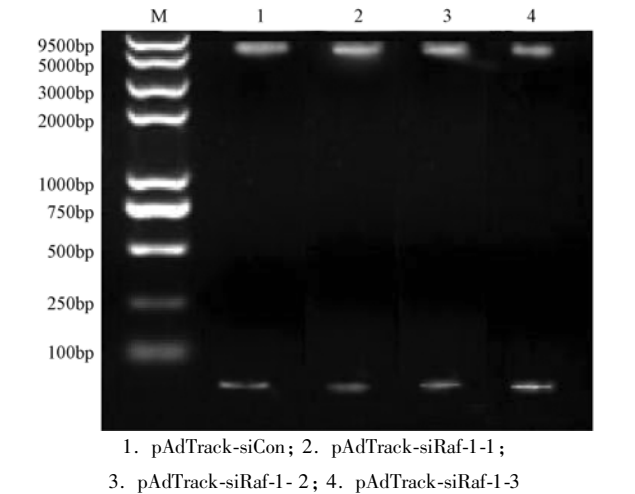


图 1 Kpn I 和 Bgl II 双酶切鉴定重组穿梭质粒

1. pAd-siCon; 2. pAd-siRaf-1-1; 3. pAd-siRaf-1-2; 4. pAdT-siRaf-1-3

Fig. 1 pAdTrack-siRaf-1 identified by Kpn I and Bgl II digestion

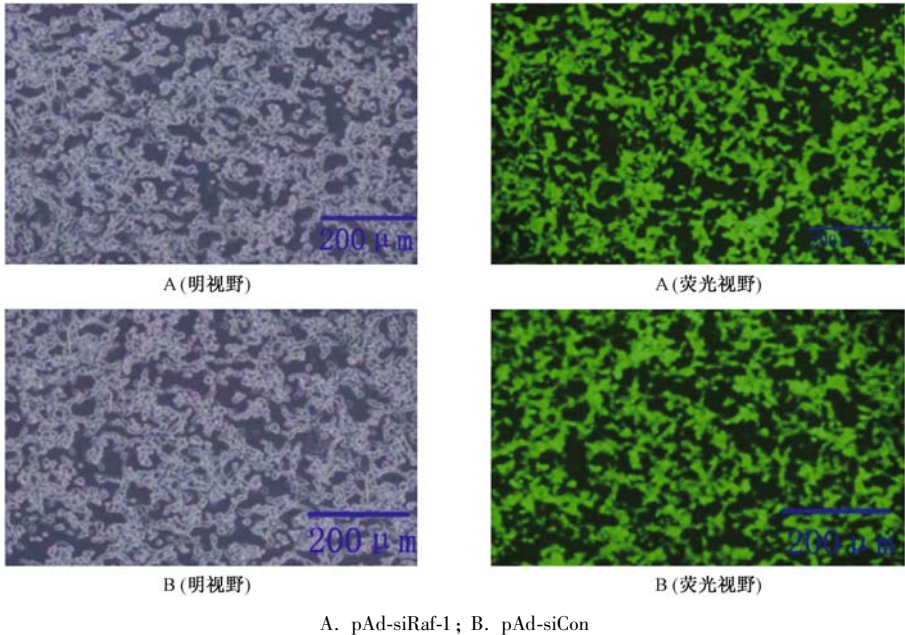
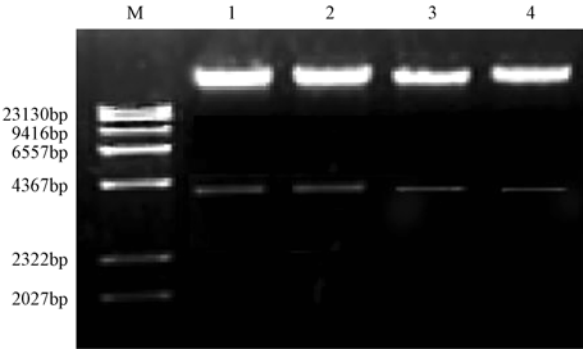


图 3 pAd-siRaf-1 及 pAd-siCon 重组腺病毒包装和转导 293 细胞(标尺 = 200μm)

Fig. 3 pAd-siRaf-1 and pAd-siCon recombinant adenovirus packaged and transduced into 293 cells (Bar = 200)

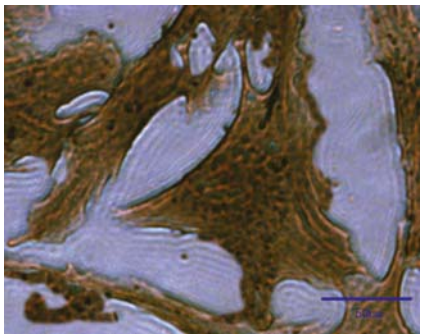
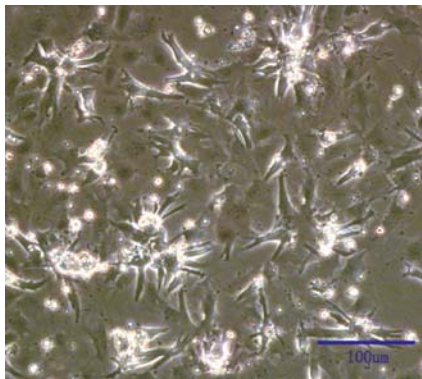
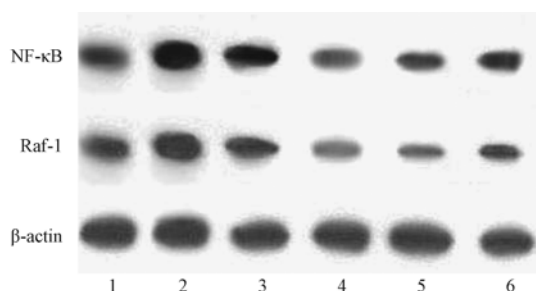


表 2 重组腺病毒对心肌细胞 Raf-1, NF- κ B 蛋白表达、表面积及 [3 H]-leu 掺入率的影响**Tab. 2** Effect of recombinant adenovirus on the expression of Raf-1 and NF- κ B proteins, the surface area and [3 H]-leu incorporation of the cardiomyocytes ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别 Groups	细胞表面积 Surface area (μm^2)	[3 H]-leu 掺入率 [3 H]-leu incorporation (dpm)	Raf-1 蛋白表达 Expression of Raf-1 protein	NF- κ B 蛋白表达 Expression of NF- κ B protein
Control	567.48 $\pm$ 6.24	151.23 $\pm$ 11.34	0.53 $\pm$ 0.04	0.74 $\pm$ 0.04
Ang II	1421.17 $\pm$ 13.83 **	387.47 $\pm$ 21.13 **	0.91 $\pm$ 0.07 **	1.51 $\pm$ 0.11 **
Ang II + pAd-siCon	1572.38 $\pm$ 9.24 **	359.68 $\pm$ 14.31 **	0.86 $\pm$ 0.03 ##	1.35 $\pm$ 0.08 **
Ang II + pAd-siRaf-1-1	738.22 $\pm$ 9.39 * ##	212.41 $\pm$ 16.21 * ##	0.29 $\pm$ 0.02 * ##	0.51 $\pm$ 0.06 * ##
Ang II + pAd-siRaf-1-2	1092.24 $\pm$ 15.32 **	317.58 $\pm$ 18.48 **	0.35 $\pm$ 0.05 * ##	0.64 $\pm$ 0.05 ##
Ang II + pAd-siRaf-1-3	1191.41 $\pm$ 16.52 **	328.24 $\pm$ 13.22 **	0.55 $\pm$ 0.04 ##	0.75 $\pm$ 0.07 ##

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, Compared with the control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ Compared with the Ang II group.1. 对照组; 2. Ang II 组; 3. Ang II + pAd-siCon group;
4~6. Ang II + pAd-siRaf-1-1~3 组**图 6** 重组腺病毒对心肌细胞中 Raf-1 及 NF- κ B 蛋白表达的影响**Fig. 6** The expression of Raf-1 and NF- κ B after the cardiomyocytes were transduced with pAd-siRaf-1 and pAd-siCon recombinant adenovirus

3 讨论

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是一种新近发展起来的能有效阻断基因表达的技术。本研究以含有表达绿色荧光蛋白基因的 pAdTrack-CMV 为穿梭载体, 能方便地观察转染效果, 利用缺失了腺病毒 E1 区基因骨架质粒 pAdeasy-1, 避免腺病毒对靶细胞的损害; 采用细菌内同源重组 AdEasy 系统, 构建针对 Raf-1 基因的 siRNA 重组腺病毒载体, 应用基因转染技术, 将其转染入 293 细胞, 在该细胞中成功地包装成含 siRaf-1 的腺病毒颗粒后, 经纯化浓缩, 滴度达到 3.8×10^{10} pfu/mL, 转导入大鼠心肌细胞, 有效地沉默了 Raf-1 的表达, 而无关序列构建的阴性对照病毒, 转染效率与干扰病毒相当, 但不影响 Raf-1 表达。

心肌肥厚是心室重构的重要病理学特征, 与心肌缺血、心力衰竭等的发生发展密切相关, 心肌细胞是心肌肥厚的主要效应细胞, 表现为心肌细胞肥大。Raf-1 蛋白是由 raf 基因编码的蛋白产物, 由

648 个氨基酸组成, 有多个丝氨酸磷酸化位点和酪氨酸磷酸化位点^[5,6], RAS/RAF/MEK/ERK 信号转导过程与细胞生长、细胞周期停滞有关, 对培养心肌细胞的肥厚反应有重要的调节作用^[7], 但也有报道提示抑制 RAS/RAF 激活并不能减轻心肌细胞肥大反应。本实验通过构建 Raf-1 基因重组腺病毒 siRNA 研究其对心肌肥大的影响, 发现 pAd-siRaf-1-1~3 重组腺病毒均能显著抑制 Ang II 诱导的心肌细胞表面积及 [3 H]-Leu 掺入率, 提示 pAd-siRaf-1 重组腺病毒确具有抗心肌细胞肥大的作用, 从基因水平证实 Raf-1 对心肌细胞肥大具有促进作用。

NF- κ B 为转录因子蛋白家族成员, 静息状态下, NF- κ B 与其抑制蛋白以非活性的形式存在于胞浆中。当细胞因子、LPS 等刺激时, NF- κ B 激酶复合物 IKKs (κ B kinases) 被激活, 使 κ B 经快速磷酸化、泛素化后降解, 暴露出 NF- κ B 的 DNA 结合域, NF- κ B 发生核移位并与相应靶基因上特定的 κ B 序列结合, 启动靶基因的转录^[8], Raf-1/MEK/MAPK 是激活 IKK 的主要信号通路^[9,10]。研究表明 NF- κ B 的激活参与糖尿病患者心肌细胞的凋亡, 且其对细胞凋亡的调控作用在早期有抑制细胞凋亡而随着时间的推移, NF- κ B 的增多也引起了大量炎症因子的产生, 其诱导细胞凋亡的作用增强, 故细胞凋亡增多。大鼠心肌纤维化模型及体外培养的心肌成纤维细胞研究均证实, 抑制 NF- κ B 可以抑制成纤维细胞的增殖, 进而抑制心肌纤维化^[11,12], RAF/NF- κ B 信号转导对心肌肥厚的作用尚不明确。本实验结果显示 Raf-1 基因重组腺病毒 siRNA 载体的能显著下调心肌细胞 Raf-1 及 NF- κ B 蛋白表达, pAd-siRaf-1-1 的作用较 pAd-siRaf-1-2~3 作用更为明显, 说明 pAd-siRaf-1 对心肌肥大的抑制作用与下调 Raf-1 表达, 进而抑制 NF- κ B 表达有关, 且对心肌细胞沉默 Raf-1 作用肥大抑制效果最佳的为 pAd-

siRaf-1-1, 证实 RAF/NF- κ B 信号转导在心肌肥厚的过程中不仅有成纤维细胞增殖的参与, 心肌细胞肥大参与了此过程。

总之, Raf-1 腺病毒 siRNA 能有效抑制心肌肥大, 且其机制与下调 Raf-1 蛋白, 进而抑制 RAF/NF- κ B 信号转导有关, 通过在基因水平高选择性地阻断 Raf-1、NF- κ B 的药物也为治疗心肌肥大提供了新思路。

参考文献:

- [1] Robbs BK, Lucena PI, Viola JP. The transcription factor NFAT1 induces apoptosis through cooperation with Ras/Raf/MEK/ERK pathway and upregulation of TNF- α expression [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1833(8): 2016–2028.
- [2] Lv C, Sun W, Sun H, et al. Asperolide A, a marine-derived tetranorditerpenoid, induces G2/M arrest in human NCI-H460 lung carcinoma cells, is mediated by p53-p21 stabilization and modulated by Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway [J]. *Mar Drugs*, 2013, 11(2): 316–331.
- [3] Yamaguchi O, Watanabe T, Nishida K, et al. Cardiac-specific disruption of the c-raf-1 gene induces cardiac dysfunction and apoptosis [J]. *J Clin Invest*, 2004, 114(7): 937–943.
- [4] Clerk A, Bogoyevitch MA, Andersson MB, et al. Differential activation of protein kinase C isoforms by endothelin-1 and phenylephrine and subsequent stimulation of p42 and p44 mitogen-activated protein kinases in ventricular myocytes cultured from neonatal rat hearts [J]. *J Biol Chem*, 1994, 269: 32848–32857.
- [5] Lorenz K, Schmitt J P, Vidal M, et al. Cardiac hypertrophy: targeting Raf/MEK/ERK1/2 signaling [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009, 41(12): 2351–2355.
- [6] Pfeleiderer P, Sumandea MP, Rybin VO, et al. Raf-1: a novel cardiac troponin T kinase [J]. *J Muscle Res Cell Motil*. 2009, 30(1–2): 67–72.
- [7] 屈春生, 陈莉萍, 李道麟. 替米沙坦对大鼠心肌肥厚组织中 Raf/MEK/ERK 信号通路的影响 [J]. *重庆医科大学学报*, 2013, 38(11): 1344–1347.
- [8] Lee M, Kim JY, Anderson WB, et al. Src tyrosine kinase inhibitor PP2 markedly enhances Ras-independent activation of Raf-1 protein kinase by phorbolmyristate acetate and H₂O₂ [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(47): 48692–48701.
- [9] Hamid T, Gu Y, Ortines RV, et al. Divergent tumor necrosis factor receptor related remodeling responses in heart failure: role of nuclear factor-kappa B and inflammatory activation [J]. *Circulation*, 2009, 119: 1386–1397.
- [10] 祝文静, 刘畅, 孟林燕, 等. 核因子- κ B 和 caspase-3 在高糖诱导的心肌细胞代谢记忆中的表达 [J]. *广东医学*, 2012, 33: 323–325.
- [11] Wu M, Han M, Li J, et al. 17 β -estradiol inhibits angiotensin II induced cardiac myofibroblast differentiation [J]. *Eur J Pharmacol*, 2009, 616: 155–159.
- [12] Young D, Popovic ZB, Jones WK, et al. Blockade of NF-kappaB using I kappa B alpha dominant-negative mice ameliorates cardiac hypertrophy in myotrophin-overexpressed transgenic mice [J]. *J Mol Biol*, 2008, 381(3): 559–568.

[修回日期] 2016-02-22

(上接第 13 页)

- 建立 [J]. *中国实验动物学报*, 2013, 21(2): 34–39.
- [4] Daugherty EK, Balmus G, Saei AA, et al. The DNA damage checkpoint protein ATM promotes hepatocellular apoptosis and fibrosis in a mouse model of non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Cell Cycle*, 2012, 11(10): 1918–1928.
- [5] Cheng Q, Li N, Chen MQ, et al. Cyclooxygenase-2 promotes hepatocellular apoptosis by interacting with TNF- α and IL-6 in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis in rats [J]. *Digest Dis Sci*, 2013, 58(10): 2895–2902.
- [6] Kathirvel E, Morgan K, French SW, et al. Acetyl-L-carnitine and lipoic acid improve mitochondrial abnormalities and serum levels of liver enzymes in a mouse model of nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Nutrit Res*, 2013, 33(11): 932–941.
- [7] García RC, Baulies A, Mari M, et al. Mitochondrial dysfunction in non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance: Cause or consequence? [J]. *Free Radical Res*, 2013, 47(11): 854–868.
- [8] 郑全喜, 王昆, 刘超. 非酒精性脂肪肝动物模型的研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(1): 357–360.
- [9] 楼琦, 石巧娟, 郭红刚, 等. 非酒精性脂肪肝大鼠脂质代谢及病理变化的动态观察 [J]. *中国比较医学杂志*, 2012, 22(3): 7–10.
- [10] 邓丽丽, 藏家娜, 应华忠, 等. 热休克蛋白 70 在兔非酒精性脂肪肝纤维化过程中的作用 [J]. *实验动物与比较医学*, 2014, 34(2): 107–111.
- [11] Thapaliya S, Wree A, Povero D, et al. Caspase 3 inactivation protects against hepatic cell death and ameliorates fibrogenesis in a diet-induced NASH model [J]. *Digest Dis Sci*, 2014, 59: 1197–1206.
- [12] Cavalcanti BC, Costa PM, Carvalho AA, et al. Involvement of intrinsic mitochondrial pathway in neosergeolide-induced apoptosis of human HL-60 leukemia cells: the role of mitochondrial permeability transition pore and DNA damage [J]. *Pharmaceut Biol*, 2012, 50(8): 980–993.

[修回日期] 2016-01-22