

· 论 著 ·

## DUSP9 对高脂喂养胰岛素抵抗 C57 小鼠胆固醇、糖异生的影响\*

杨艳<sup>1</sup>, 欧阳旭红<sup>1△</sup>, 向加林<sup>1</sup>, 黎兵<sup>1</sup>, 王凤学<sup>2</sup>, 肖俏<sup>3</sup>, 谭国毅<sup>3</sup>

(1. 遵义医学院附属医院医学检验科, 贵州遵义 563003; 2. 贵州省遵义市第一人民医院检验科, 贵州遵义 563002; 3. 遵义医学院医学检验系, 贵州遵义 563003)

**摘要:**目的 探讨 DUSP9 基因对高脂喂养诱导的胰岛素抵抗 C57 小鼠胆固醇、糖异生的影响。方法 将成功构建的 pEGFP-DUSP9 裸质粒注射随机选取的高脂喂养小鼠(HD组,  $n=10$ ), 以空载 pEGFP-N1 注射的高脂喂养小鼠为对照(HE组,  $n=10$ ), 普食喂养的为阴性对照(NC组,  $n=10$ ), 质粒注射 48 h 后分别取各组小鼠血清、肝组织, 检测总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、空腹血糖(FBG), 空腹胰岛素(FINS)等指标; 实时荧光定量 PCR(QPCR)法检测各肝组织中 DUSP9、脂代谢相关基因固醇元件结合蛋白 2(SREBP2)、低密度脂蛋白受体(LDLr)、糖异生关键酶-磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPCK)mRNA 表达的变化, Western blot 法检测 DUSP9 蛋白表达水平。结果 HD、HE 组小鼠 FBG、FINS、TC、LDL-C 水平较 NC 组明显升高( $P<0.01$ ); HD 组小鼠肝脏中 DUSP9 mRNA、蛋白表达水平均较 HE 组显著升高( $P<0.01$ ), SREBP2、LDLr mRNA 表达水平均显著增加( $P<0.01$ ), PEPCK mRNA 表达水平明显下调( $P<0.01$ ); HD 组小鼠 48 h 血清 TC、LDL-C 水平与 HE 组比较, 差异无统计学意义( $P>0.05$ )。结论 DUSP9 可能通过上调 SREBP2、LDLr 水平改善高脂喂养胰岛素抵抗 C57 小鼠的胆固醇代谢, 减少 PEPCK mRNA 的表达水平从而导致肝糖输出减少, FBG 水平降低。

关键词: DUSP9; 胰岛素抵抗; 胆固醇代谢; 糖异生

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.14.001

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)14-1561-03

## Effects of DUSP9 on cholesterol and gluconeogenesis in high-fat diet induced insulin resistance C57 mice\*

Yang Yan<sup>1</sup>, Ouyang Xuhong<sup>1△</sup>, Xiang Jialin<sup>1</sup>, Li Bing<sup>1</sup>, Wang Fengxue<sup>2</sup>, Xiao Qiao<sup>3</sup>, Tan Guoyi<sup>3</sup>(1. Department of Medical Laboratory, Affiliated Hospital, Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563003, China;  
2. Department of Laboratory, Zunyi First People's Hospital, Zunyi, Guizhou 563002, China;  
3. Department of Medical Laboratory, Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563003, china)

**Abstract:** Objective To investigate the effects of dual specificity protein phosphatases 9(DUSP9) on cholesterol and gluconeogenesis in high-fat diet induced insulin resistance C57 mice. Methods Expression vector for DUSP9 gene was successfully constructed. Naked plasmids of pEGFP-DUSP9 were injected into high-fat diet mice(HD group,  $n=10$ ) which were randomly selected, pEGFP-N1 plasmids were injected into high-fat diet mice(HE group,  $n=10$ ) as the control group, and the normal-chow diet group(NC group,  $n=10$ ) as negative control group, respectively. The blood serum and liver tissue in each group were collected at 48 h after plasmid transfection. The levels of total cholesterol(TC), low-density lipoprotein cholesterol(LDL-C), fasting blood glucose(FBG), fasting insulin(FINS) were detected. The mRNA expression of DUSP9, SREBP2 and LDLr were examined by QPCR. DUSP9 protein levels were determined by Western blot. Results Compared with the NC group, the body weight, FBG, FINS, TC, LDL-C levels in the HD and the HE groups were significantly increased( $P<0.05$ ). DUSP9 mRNA and protein levels in the HD group were obviously increased compared with the HE group. The expression of SREBP2 and LDL-R mRNA were increased and the mRNA levels of PEPCK were down-regulated compared with HE group. The serum levels of TC and LDL-C after transfection 48 h were not changed in the HD group(all  $P>0.05$ ). Conclusion DUSP9 may improve hypercholesterolemia by up-regulating SREBP2 and LDL-r levels and decreased hepatic glucose output and fasted glucose levels by down-regulating the mRNA levels of PEPCK in high-fat diet induced insulin resistance C57 mice.

Key words: dual specificity protein phosphatases 9; insulin resistance; cholesterol metabolism; gluconeogenesis

肝脏作为胰岛素作用的重要靶器官之一, 在糖、脂质代谢作用中扮演着重要角色。当机体处于饥饿时或空腹状态下, 肝脏则通过糖异生和糖原分解途径来维持血糖的正常水平。脂质代谢作为三大营养物质代谢之一, 其信号传导途径是复杂而精细的, 它主要参与了机体的能量供应和储存, 生物膜的构成及其他一些重要的生命过程。胰岛素抵抗(IR)、2型糖尿病(T2DM)和肥胖常伴随着糖、脂质代谢紊乱, 因此阐明肝糖、脂质代谢的信号传导途径将对这些疾病的防治产生深远的影响。

dual specificity protein phosphatases 9(DUSP9)基因属于酪氨酸蛋白磷酸酶超家族, 可通过去磷酸化、钝化促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)关键的酪氨酸和苏氨酸残基, 调控 MAPK 的功能<sup>[1-2]</sup>。研究发现, 人源与小鼠 DUSP9 同源性为 83%, 在胎盘、肝脏、肾脏中高表达, 且在发育进程中是可调型表达<sup>[3-4]</sup>。在对中汉族人口较瘦人群的一项研究中发现, DUSP9 SNPs 与 T2DM 高风险相关<sup>[5]</sup>。其在 IR 进程中的作用机制及分子靶点尚未清楚, 与糖脂代谢相关研究也甚少。本

\* 基金项目: 贵州省优秀科技教育人才省长资金项目[黔省合专字(2009)49]。作者简介: 杨艳(1980~), 讲师, 硕士研究生, 主要从事糖脂代谢紊乱研究。△ 通讯作者, Tel: 13765237330; E-mail: Ouyxhong0603@163.com。

研究通过体内过表达 DUSP9, 欲探讨 DUSP9 对胆固醇、糖异生可能的作用及机制, 为进一步研究 DUSP9 生理功能及其在糖脂代谢、IR 进程中的作用提供相关的实验依据及理论基础。

## 1 材料与与方法

**1.1 材料** 实验动物: 健康雄性 C57 小鼠 30 只, 4 周龄, 购自第三军医大学大坪医院野战外科研究所动物研究中心。试剂: 总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、血糖(GLU)检测试剂盒购自 Olympus 公司; RNA 提取试剂盒、Prime-Script™ RT reagent Kit、SYBR Premix Ex Taq™ 购自 TaKaRa 公司; 全蛋白提取试剂盒、二辛可酸(BCA)法蛋白检测试剂盒均购自凯基公司; 去内毒素质粒大抽试剂盒购自北京天根生化科技公司; 兔抗小鼠 DUSP9 一抗购自 Abnova 公司; 兔抗小鼠  $\beta$ -actin 一抗、辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG 二抗购自武汉博士德生物工程有限公司; 小鼠胰岛素测定试剂盒购自美国 Linco 公司。高脂饲料购自上海斯莱克动物有限责任公司, 所有引物均由大连宝生物合成。

## 1.2 方法

**1.2.1 动物分组及喂养** 将小鼠 30 只适应性喂养 1 周后, 随机分为普食喂养组(NC 组,  $n=10$ )和高脂喂养组( $n=20$ )。高脂喂养组再根据注射质粒不同分为 HD 组(注射 pEGFP-DUSP9)和 HE 组(注射空载 pEGFP-N1), 各 10 只。NC 组给予普食(碳水化合物 60%, 蛋白质 21%, 脂肪 19%), 高脂喂养组给予高脂饲料(碳水化合物 37.1%, 粗蛋白 20%, 脂肪 42.9%), 共喂养 25 周。

**1.2.2 IR、高脂血症动物模型的构建评价** 采用稳态模式评估法(HOMA)计算 IR 指数, 即  $HOMA-IR = (FBG \times FINS) / 22.5$ 。操作遵照各试剂盒说明书。各组小鼠空腹 8~10 h, 摘眼球取血, 迅速分离血清, 全自动生化分析仪 OLYMPUS5400 检测空腹血糖(FBG)、TC、LDL-C 水平。

**1.2.3 流体力学裸质粒尾静脉注射转染各实验小鼠** 高脂喂养组小鼠空腹 8~12 h, 将去内毒素的 pEGFP-N1(HE 组)或 pEGFP-DUSP9 裸质粒(HD 组)通过尾静脉注射, 总剂量为 50  $\mu$ g/只, 每只鼠每次 25  $\mu$ g, 24 h 后加强注射 1 次。48 h 取血后, 将 HE、HD 组小鼠处死, 取肝组织提取总 RNA 和组织全蛋白, 采用 QPCR 法检测 DUSP9 mRNA 表达水平, Western blot 检测 DUSP9 蛋白表达水平, 其中 QPCR 检测结果的比较以  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  值表示基因的相对表达量, 所用引物见表 1。

**1.2.4 肝组织中 SREBP2、LDL-r、PEPCK mRNA 表达的检测** 质粒转染 48 h 后, 取各小鼠肝组织 100 mg 匀浆并提取总 RNA, 逆转录合成 cDNA, QPCR 检测 DUSP9、SREBP2、LDL-r mRNA 的表达水平。各引物序列见表 1。

表 1 QPCR 引物序列

基因	引物(5'~3')	扩增片段长度(bp)
$\beta$ -actin	上游: GCTGTCCCTGTATGCCTCT	220
	下游: GATGTCACGCACGATTTCC	
DUSP9	上游: GCTTCAGTGGTTCGTGCCG	166
	下游: GGAGGGGATGTGGTGTTC	
SREBP2	上游: CTGGTACGCTGGTACTCAA	263
	下游: GCTGTACAGGTGGATCTCAAT	
LDL-r	上游: GAACTCAGGGCCTCTGTCTG	188
	下游: GAAACCATGCGTGTATCCCT	
PEPCK	上游: TCAACACCGACCTCCCTT	176
	下游: AGCATTGTGCCCTAICT	

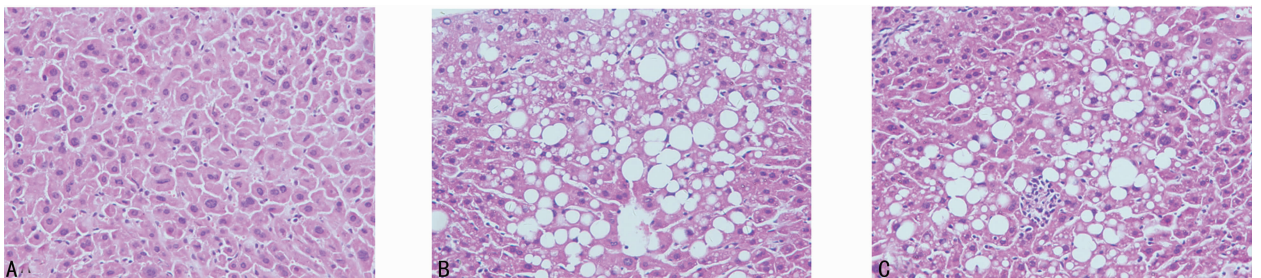
**1.2.5 相关生化指标的检测** 采用胰岛素放免试剂盒检测小鼠胰岛素水平, 己糖激酶法检测 FBG 水平。胆固醇氧化酶法检测 TC、表面活性剂清除法(SUR 法)检测 LDL-C。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间数据比较采用单因素方差分析, HE、HD 组间比较采用独立样本  $t$  检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 IR 及相关生化指标的变化特征** 高脂喂养组小鼠较 NC 组小鼠 FBG 均增高( $P < 0.01$ ), IR 指数增加, 表明 IR 加重, 同时 TC、LDL-C 均呈不同程度增高( $P < 0.01$ ), 但质粒注射后 48 h, HD 组较 HE 组小鼠血清中 TC、LDL-C 未见明显改变( $P > 0.05$ ), 见表 2。HD 组 FBG 较注射 pEGFP-DUSP9 前明显降低( $P < 0.01$ )。HD、HE 组小鼠肝细胞内出现大小不等脂滴, 呈现中度脂肪变性, 局部可见炎症细胞浸润。NC 组小鼠肝细胞未观察到明显的脂质沉积, 见图 1。

**2.2 DUSP9 过表达的验证** QPCR、Western blot 检测结果显示, HD 组 DUSP9 mRNA 表达水平较 HE 组明显上调, 是 HE 组小鼠的 17.3 倍( $P < 0.01$ ), HD 组 DUSP9 蛋白表达水平较 HE 组也呈高表达[(1.22  $\pm$  0.08) vs. (0.91  $\pm$  0.10),  $P < 0.05$ ], 提示 DUSP9 质粒成功转染高脂喂养 C57 小鼠, 见图 2、3。



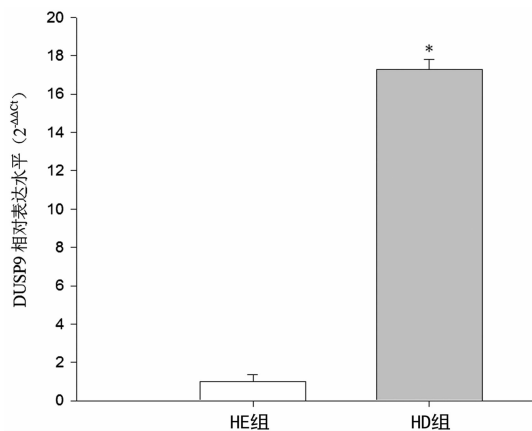
A: NC 组; B: HD 组; HE 组。

图 1 3 组小鼠肝组织形态学改变(苏木精-伊红染色  $\times 20$ )

表 2 3 组小鼠血生化指标比较( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

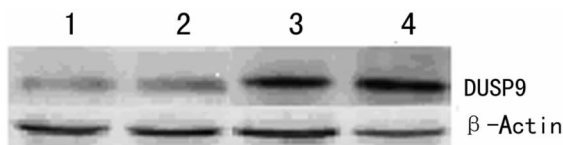
组别	FBG(mmol/L)	FINS(mU/L)	HOMA-IR	TC(mmol/L)	LDL-C(mmol/L)
NC 组	8.44 $\pm$ 0.61	12.40 $\pm$ 1.12	4.74 $\pm$ 0.44	3.09 $\pm$ 0.35	0.48 $\pm$ 0.07
HE 组	12.29 $\pm$ 1.06*	15.39 $\pm$ 0.64*	8.47 $\pm$ 0.73*	4.68 $\pm$ 0.84	1.10 $\pm$ 0.26
HD 组	10.72 $\pm$ 0.83*	15.29 $\pm$ 0.68*	7.28 $\pm$ 0.69*	4.38 $\pm$ 0.71	0.97 $\pm$ 0.20

\*:  $P < 0.01$ , 与 NC 组比较。



\*:  $P < 0.01$ , 与 HE 组比较。

图 2 两组小鼠 DUSP9 mRNA 的相对表达量比较



1,2: HE 组; 3,4: HD 组。

图 3 两组小鼠 DUSP9 蛋白表达水平

**2.3 SREBP2、LDL-r、PEPCK mRNA 表达水平** HD 组小鼠肝脏组织 SREBP2 相对表达量较 HE 组上调 7.41 倍 ( $P < 0.01$ )、LDL-r mRNA 相对表达量是 HE 组小鼠的 5.94 倍 ( $P < 0.01$ )、PEPCK mRNA 表达水平较 HE 组下调 54% ( $P < 0.01$ )。

### 3 讨论

IR 是由遗传和环境因素共同所致,肝内选择性 IR,肝糖原增加,肝糖原合成减少且分解加强,肝糖输出增加,促使 FBG 和餐后血糖均升高。这一效应是反常的,按理胰岛素刺激脂肪合成,IR 时肝脏脂肪理应减少,但实际上是增加的,显然肝脏 IR 在糖尿病研究中非常重要。

DUSP9 作为一个肿瘤相关基因,在恶性肿瘤透明细胞内其表达下调与疾病的预后不良存在密切关联<sup>[6]</sup>;除可调控 MAPK 活性外,还作为骨形态发生蛋白(BMP)信号转导的调节子参与调控胞外调节蛋白激酶(ERK)的活性,从而决定小鼠胚胎干细胞命运<sup>[7]</sup>。有限地研究表明 DUSP9 参与了 IR 这一进程,但其促进 IR 发生还是抑制 IR 仍存在不同观点。本研究通过长期高脂喂养方式构建 IR、高胆固醇血症的小鼠模型,拟通过流体力学尾静脉注射裸质粒方式介导 DUSP9 基因有效在肝组织形成过表达,初步探讨 DUSP9 在 IR 的病理条件下对肝胆固醇、糖异生可能的作用。本研究结果表明,高脂喂养组小鼠 FBG、FINS 水平及 HOMA-IR 均较 NC 组明显增高,且形成高胆固醇血症,提示造模成功。

流体力学注射是进行基因功能研究的一种有效方式<sup>[8-10]</sup>,通过尾静脉注射方式能在肝中形成有效表达<sup>[7]</sup>。本研究采用分次注射加强法<sup>[11]</sup>,即每次 25 μg/100 μL(生理盐水),注射 24 h 后再加强 1 次,质粒总剂量为 50 μg。通过 QPCR、Western blot 法验证 HD 组 DUSP9 mRNA、蛋白表达水平均较 HE 组明显上调,即形成有效的高表达,说明 DUSP9 质粒成功转染高脂喂养小鼠。

对于大多数组织来说,保证胆固醇的供给,维持其代谢平衡是十分重要的。细胞内胆固醇的来源主要有内源性合成和

外源性摄入,均通过依赖于细胞内胆固醇水平的反馈调节系统精密调控胆固醇的内稳态,即主要通过 SCAP-SREBP2-LDLr/HMGCoA reductase 通路来实现。SREBP2 属固醇调节元件结合蛋白家族(sterol regulatory element binding proteins, SREBPs)成员之一,主要参与调控乙酰辅酶 A 合成胆固醇<sup>[12]</sup>。

LDLr 是一种位于细胞表面的跨膜受体,在肝脏中表达最为丰富<sup>[13]</sup>。体内大部分胆固醇结合于低密度脂蛋白(LDL),主要经肝细胞表面的 LDLr 代谢和清除;另外,LDLr 摄取胆固醇进入细胞内,用于细胞增殖和固醇类激素及胆汁酸盐的合成等。SREBP-2 与固醇调节元件(SRE)结合可促进 LDLr 的高效转录;本研究结果表明,过表达 DUSP9 使小鼠肝 SREBP2、LDLr mRNA 表达水平上调,这个可能是表达上调的 SREBP2 与其固醇调节元件结合促使 LDLr 转录活性增强。而增加的 LDLr 可清除 LDL-C,从而可有效改善高胆固醇血症,但本研究中仅取了质粒注射后 48 h 的血清检测了 LDL-C,尚未检测更较长时间 LDL-C 的水平。由于血清中胆固醇的变化较其调控基因 mRNA 变化水平慢,且释放入血液中尚需一定时间,故 48 h 血清中 LDL-C 的水平未发生明显变化可能与此相关。本研究会在后续实验中监测血清中 LDL-C 可能发生变化的时间如 72、96、120 h。

肝糖异生是肝糖代谢的重要组成部分,受一系列转录因子的调控。PEPCK 是糖异生途径的关键酶,其转录的多少决定着糖异生的速度<sup>[14]</sup>,其存在两种同工酶,即 PEPCK-C(存在于胞质)和 PEPCK-M(存在于线粒体),其中 PEPCK-C 是催化糖异生第一步的关键酶,且大量证据表明其活力与血糖控制相关<sup>[15]</sup>。本研究结果中,HD 组 PEPCK mRNA 表达水平较 HE 组明显下调,FBG 水平下降,这可能是因为下调的 PEPCK 导致肝糖输出增加,而 FBG 与肝糖输出量呈正相关。

总之,本研究显示,过表达的 DUSP9 能上调 SREBP2、LDLr mRNA 及下调 PEPCK mRNA 的表达,能降低肝胆固醇、FBG 水平,但不能降低血胆固醇水平,SREBP2、LDLr、PEPCK 可能是 DUSP9 参与胆固醇代谢、糖异生调控的有效靶点,这将为开发 IR 等代谢综合征药物提供重要的理论依据。

### 参考文献:

- [1] Teng CH, Huang WN, Meng TC. Several dual specificity phosphatases coordinate to control the magnitude and duration of JNK activation in signaling response to oxidative stress[J]. J Biol Chem, 2007, 282(39): 28395-28407.
- [2] Emanuelli B, Eberlé D, Suzuki R, et al. Overexpression of the dual-specificity phosphatase MKP-4/DUSP-9 protects against stress-induced insulin resistance[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(9): 3545-3550.
- [3] Xu H, Dembski M, Yang Q, et al. Dual specificity mitogen-activated protein(MAP) kinase phosphatase-4 plays a potential role in insulin resistance[J]. J Biol Chem, 2003, 278(32): 30187-30192.
- [4] Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, et al. A central role for JNK in obesity and insulin resistance[J]. Nature, 2002, 420(6913): 333-336.
- [5] Bao XY, Peng B, Yang MS. Replication study of novel risk variants in six genes with type 2 diabetes and related quantitative traits in the Han Chinese lean individuals[J]. Mol Biol Rep, 2012, 39(3): 2447-2454. (下转第 1567 页)

在侵袭性,在膀胱移行细胞癌的早期发生及发展中有重要作用。本研究中,在尿沉渣细胞与膀胱癌组织中的甲基化总体符合率为 84.2%(16/19),二者在检测 WWOX 基因启动子区甲基化方面有显著的相关性( $P < 0.05$ ),提示尿沉渣细胞遗传信息丢失不多,检测尿沉渣细胞可以基本准确地反映膀胱癌组织的甲基化情况。因此,尿沉渣细胞中 WWOX 基因启动子区甲基化的检测,可以作为膀胱癌早期诊断的无创指标。

早期膀胱癌患者术后必须定期随访,并行膀胱镜及尿液查瘤细胞检查,此两项检查均有其局限性<sup>[12]</sup>;通过检测尿液中细胞或蛋白质水平指标如膀胱肿瘤抗原(BTA)、核基质蛋白 22(NMP22)、尿纤维蛋白降解产物(FDP)等诊断或监测膀胱癌的复发,但这些方法的敏感性和特异性均不十分理想<sup>[13]</sup>。近年来,膀胱癌患者尿沉渣细胞 DNA 的 MSP 检测方法以其高敏感性、高特异性成为一个重要临床检验方法,为初发及复发性膀胱癌提供了一个简单无创的检测方法,用于膀胱癌的诊断与随访<sup>[14]</sup>。另外,膀胱癌的发病是一个多基因决定的综合事件。因此,可以将 WWOX 与其他多种在膀胱癌中高频甲基化的基因组为膀胱癌的 DNA 甲基化谱,进行尿液样本的 DNA 甲基化谱检测,将为膀胱癌的早期诊断及预后判断提供一种新的、无创性的手段<sup>[15]</sup>。

#### 参考文献:

- [1] 林向阳. 医源性男性尿道损伤原因及防治[J]. 现代泌尿外科杂志, 2009, 14(3): 232.
- [2] 马建波, 廖于峰, 魏任雄, 等. 膀胱癌尿沉渣 PTEN 基因启动子 CpG 岛异常甲基化研究[J]. 医学研究杂志, 2011, 40(7): 85-87.
- [3] 杨青, 李俊. 膀胱癌尿脱落细胞学检查与尿液肿瘤标志物研究进展[J]. 安徽医药, 2012, 16(4): 528-529.
- [4] 郭战军, 林英立, 张春霆. DNA 甲基化在膀胱癌中的研究进展[J]. 国际泌尿系统杂志, 2011, 31(5): 653-655.
- [5] Salah Z, Aqeilan R, Huebner K. WWOX gene and gene product; tumor suppression through specific protein inter-

actions[J]. Future Oncol, 2010, 6(2): 249-259.

- [6] Bednarek AK, Laflin KJ, Daniel RL, et al. WWOX, a novel WW domain-containing protein mapping to human chromosome 16q23. 3-24. 1, a region frequently affected in breast Cancer[J]. Cancer Res, 2000, 60(8): 2140-2145.
- [7] Bouteille N, Driouch K, Hage PE, et al. Inhibition of the Wnt/beta-catenin pathway by the WWOX tumor suppressor protein[J]. Oncogene, 2009, 28(28): 2569-2580.
- [8] 郭雪涛, 崔明玉. 多基因改变与膀胱肿瘤生物学行为的关系及相关性研究[J]. 包头医学院学报, 2006, 22(4): 460-462, 465.
- [9] Estécio MR, Issa JP. Dissecting DNA hypermethylation in Cancer[J]. FEBS Lett, 2011, 585(13): 2078-2086.
- [10] 温机灵, 周祥福. 抑癌基因启动子区域 CpG 岛甲基化与膀胱癌的研究进展[J]. 国际泌尿系统杂志, 2008, 28(4): 444-448.
- [11] 穆大为, 周利群, 丁义, 等. 应用荧光原位杂交技术检测上尿路的尿路上皮癌可显著提高诊断敏感性[J]. 北京大学学报: 医学版, 2010, 42(4): 381-385.
- [12] 毕长富, 张克荣, 董浩, 等. 膀胱癌诊断治疗的新进展[J]. 河北中医, 2011, 33(12): 1899-1901.
- [13] 郭宏骞, 孙西钊, 孙则禹. 几种检测膀胱癌的新方法[J]. 临床泌尿外科杂志, 2000, 15(12): 570-572.
- [14] Chung W, Bondaruk J, Jelinek J, et al. Detection of bladder Cancer using novel DNA methylation biomarkers in urine sediments[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2011, 20(7): 1483-1491.
- [15] Pu RT, Laitala LE, Clark DP. Methylation profiling of urothelial carcinoma in bladder biopsy and urine[J]. Acta Cytol, 2006, 50(5): 499-506.

(收稿日期: 2012-10-08 修回日期: 2013-01-22)

(上接第 1563 页)

- [6] Wu S, Wang Y, Sun L, et al. Decreased expression of dual-specificity phosphatase 9 is associated with poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma[J]. BMC Cancer, 2011, 11(413): 413.
- [7] Li Z, Fei T, Zhang J, et al. BMP4 signaling Acts via dual-specificity phosphatase 9 to control ERK activity in mouse embryonic stem cells[J]. Cell Stem Cell, 2012, 10(2): 171-182.
- [8] Liu F, Song Y, Liu D. Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA [J]. Gene Ther, 1999, 6(7): 1258-1266.
- [9] Zhang G, Budker V, Wolff JA. High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA[J]. Hum Gene Ther, 1999, 10(10): 1735-1737.
- [10] Liu D, Knapp JE. Hydrodynamics-based gene delivery [J]. Curr Opin Mol Ther, 2001, 3(2): 192-197.

- [11] Schlaepfer IR, Eckel RH. Plasma triglyceride reduction in mice after direct injections of muscle-specific lipoprotein lipase DNA[J]. Diabetes, 1999, 48(1): 223-227.
- [12] Weber LW, Boll M, Stampfl A. Maintaining cholesterol homeostasis: sterol regulatory element-binding proteins [J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(21): 3081-3087.
- [13] Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis [J]. Science, 1986, 232(4746): 34-47.
- [14] Goto M, Yoshioka T, Battelino T, et al. TNFalpha decreases gluconeogenesis in hepatocytes isolated from 10-day-old rats[J]. Pediatr Res, 2001, 49(4): 552-557.
- [15] Gómez-Valadés AG, Vidal-Alabró A, Molas M, et al. Overcoming diabetes-induced hyperglycemia through inhibition of hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) with RNAi[J]. Mol Ther, 2006, 13(2): 401-410.

(收稿日期: 2012-09-08 修回日期: 2013-02-22)