

DOI:10.16781/j.0258-879x.2016.11.1373

CD38 基因敲除对小鼠脾脏 B 细胞炎症因子产生的影响

焦会园^{1,2}, 陈 诚^{1,2}, 李 玲^{1,2}, 戴倩倩^{1,2}, 宋矿余¹, 李 蓉^{1,2*}

1. 南昌大学基础医学院微生物学教研室, 南昌 330006

2. 南昌大学转化医学研究院, 南昌 330031

[摘要] **目的** 分析 CD38 基因敲除小鼠脾脏中 B 细胞的数量及 B 细胞中炎症因子和去乙酰化酶 1 (SIRT1) 的表达水平, 探讨 CD38 基因敲除对 B 细胞中炎症因子的影响及其潜在机制。**方法** 采用聚合酶链反应 (PCR) 检测小鼠尾巴 CD38 和新霉素 (Neo) 基因的 DNA 表达水平; 磁珠阴选法分选出野生型 (WT) C57BL/6 和 CD38^{-/-} 小鼠脾脏中的 B 细胞, 经流式细胞仪鉴定 B 细胞分选纯度; 实时定量 PCR 检测 CD38 和炎症因子肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 1 β (IL-1 β) 基因的 mRNA 表达水平; 蛋白质印迹法检测 CD38 及 SIRT1 的蛋白表达水平。**结果** 鉴定 CD38^{-/-} 小鼠, 并成功分选出 WT 和 CD38^{-/-} 小鼠脾脏中的 B 细胞 (纯度 > 95%)。与 WT 小鼠相比, CD38^{-/-} 小鼠脾脏发育障碍, 脾细胞总数及其中的 B 细胞数量均减少 ($P < 0.01$), 伴炎症因子 TNF- α 和 IL-1 β mRNA 表达水平下降 ($P < 0.01$), SIRT1 蛋白表达水平上升 ($P < 0.05$)。**结论** CD38 基因敲除可引起脾脏 B 细胞数量减少; 并可能通过激活 SIRT1 通路, 抑制脾脏 B 细胞中炎症因子 TNF- α 和 IL-1 β 的表达。

[关键词] CD38 基因; B 淋巴细胞; 炎症因子; 去乙酰化酶; 肿瘤坏死因子 α ; 白介素 1 β

[中图分类号] R 392 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2016)11-1373-05

Effects of CD38 gene knockout on inflammatory cytokine production in murine spleen B-cells

JIAO Hui-yuan^{1,2}, CHEN Cheng^{1,2}, LI Ling^{1,2}, DAI Qian-qian^{1,2}, SONG Kuang-yu¹, LI Rong^{1,2*}

1. Department of Microbiology, Faculty of Basic Medical Sciences, Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi, China

2. Institute of Translational Medicine, Nanchang University, Nanchang 330031, Jiangxi, China

[Abstract] **Objective** To analyze the number of spleen B-cells and the expression of inflammatory factors and sirtuin 1 (SIRT1) in spleen B-cells of CD38^{-/-} mice, so as to explore the effects of CD38 gene knockout on inflammatory factors in B-cells and its potential mechanism. **Methods** The DNA levels of CD38 and Neo gene in mouse tail tissues were detected by polymerase chain reaction (PCR). Spleen B-cells from wide-type (WT) C57BL/6 and CD38^{-/-} mice were sorted by magnetic activated cell sorting (MACS), and the purity of sorting B-cells were identified by flow cytometry. The mRNA levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) and CD38 gene were detected by real-time PCR, the protein expressions of CD38 and SIRT1 were detected by Western blotting analysis. **Results** We confirmed the successful establishment of CD38^{-/-} mice and sorted spleen B-cells from WT and CD38^{-/-} mice (purity > 95%). Compared with WT mice, the development of spleen was hampered in the CD38^{-/-} mice, the number of spleen cells and spleen B-cells were significantly reduced ($P < 0.01$), the mRNA levels of TNF- α and IL-1 β were significantly decreased ($P < 0.01$), and the expression level of SIRT1 was significantly increased in CD38^{-/-} mice ($P < 0.05$). **Conclusion** CD38 gene knockout can reduce the number of B-cells in the spleen; and it can inhibit the expression of inflammatory factors (TNF- α and IL-1 β) in spleen B-cells by activating SIRT1 pathway.

[Key words] CD38 gene; B-lymphocytes; inflammation factors; sirtuins; tumor necrosis factor- α ; interleukin-1 β

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2016, 37(11): 1373-1377]

B 细胞发育是一个有序、多步骤的成熟和选择过程, 成熟 B 细胞的主要功能是通过分泌抗体介导体液免疫, 还具有分泌细胞因子调节免疫应答的

作用, B 细胞发育障碍可引起体液免疫缺陷^[1]、肿瘤^[2]和自身免疫性疾病等。CD38 在心血管疾病、肿瘤^[3]及代谢性疾病^[4]中具有广泛的调节作用, 但关

[收稿日期] 2016-08-25 **[接受日期]** 2016-10-18

[基金项目] 国家自然科学基金(81302600)。Supported by National Natural Science Foundation of China (81302600)。

[作者简介] 焦会园, 硕士生。E-mail: 928168438@qq.com

* 通信作者 (Corresponding author)。Tel: 0791-86360556, E-mail: rongli@ncu.edu.cn

于其在调节免疫细胞发育中的报道较少,仅 Rodríguez-Alba 等^[5]报道 $CD38^{-/-}$ 小鼠脾脏中 B 细胞发育障碍,而 B 细胞发育障碍常伴体液免疫反应的下降,因此 CD38 可能与自身免疫性疾病密切相关。由于 CD38 与去乙酰化酶 1 (sirtuin 1, SIRT1) 共用底物烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide, NAD^+), 二者之间存在负相关作用,即 CD38 基因缺陷会引起 SIRT1 活性升高,而 SIRT1 可通过去乙酰化其底物调节基因沉默,如通过抑制 NF- κ B 的转录活性来抑制肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 等炎症因子的表达,在肿瘤、炎症及心血管疾病等方面有广泛调节作用^[6],但 SIRT1 在 B 细胞发育中的作用尚未见报道。炎症因子的表达可影响 B 细胞的发育,Ueda 等^[7]报道, TNF- α 可以模拟佐剂诱导的 B 淋巴细胞发育异常, TNF- α 缺陷则对小鼠有保护作用。 $CD38^{-/-}$ 小鼠脾脏 B 细胞中炎症因子的表达如何? 是否与其 B 细胞发育障碍相关? SIRT1 在其中扮演什么角色? 本研究旨在通过分析 $CD38^{-/-}$ 小鼠脾脏中 B 细胞的数量及其炎症因子 TNF- α 和白细胞介素 1β (interleukin- 1β , IL- 1β) 及 SIRT1 的表达水平,探讨 CD38 基因敲除对 B 细胞中炎症因子的影响及 SIRT1 的潜在作用机制,为进一步研究 CD38 基因敲除与自身免疫性疾病的关系奠定实验基础。

1 材料和方法

1.1 主要试剂 蛋白酶 K、 $2\times$ Taq PCR Mix、DL1000 DNA marker、ACK 红细胞裂解液、TRIzol 试剂、BCA 蛋白定量试剂盒、ECL 化学发光试剂盒、PrimeScriptTM 反转录试剂盒、SYBR[®] Premix Ex Taq 均购自 TaKaRa 公司, MagniSortTM 小鼠 B 细胞分选试剂盒、PE/Cy5.5 抗小鼠 CD45R 抗体、FITC 抗小鼠 CD3e 抗体均购自 eBioscience 公司, SirT1 (D1D7) 兔源单克隆抗体、CD38 鼠源单克隆抗体购自 Cell Signaling Technology 公司, GAPDH 兔源多克隆抗体购自 Proteintech 公司, 胎牛血清、RIPA 裂解液购自 Invitrogen 公司。

1.2 仪器 Thermo Lynx4000 高速离心机 (Thermo 公司), BD FACSCantoTM II 流式细胞仪、BioRad S-1000 PCR 仪 (BD 公司), ABI 7500 实时定量 PCR 仪 (ABI

公司), 水平电泳仪、垂直电泳仪 (Bio-Rad 公司), ChampGelTM 5000 全自动凝胶成像分析系统、MiniChemTM 迷你型化学发光成像仪 (北京赛智创业科技有限公司), 超纯水仪 (Millipore 公司)。

1.3 动物分组 10 周龄的 SPF 级健康 C57BL/6 (WT) 小鼠购于武汉大学动物实验中心 [动物生产许可证号: SCXK (鄂) 2008-0004]; $CD38^{-/-}$ 小鼠由南昌大学转化医学研究院辛洪波教授惠赠 [动物使用许可证号: SYXK (赣) 2015-0003]; 所有小鼠均在南昌大学转化医学研究院 SPF 动物中心按雌: 雄 = 2: 1 合笼饲养, 取 6 周雌鼠用于本研究, 小鼠分为 WT 和 $CD38^{-/-}$ 两组。

1.4 $CD38^{-/-}$ 小鼠的鉴定 $CD38$ 基因敲除是通过同源重组导致一个 1.6 kb 的 $CD38$ 基因组区域 (第 2 和第 3 外显子) 被更换, 其中包括被公认的 NAD 水解酶位点, $CD38$ 基因的靶向载体带有新霉素 (*Neo*) 抗性片段。因此, 剪长约 1 cm 的小鼠尾巴, 经 RIPA 裂解液和蛋白酶 K 处理后提取 DNA; 依据 $CD38$ 基因敲除的原理, 通过 Generunner 软件对目的片段进行引物设计 ($CD38$ 上游引物: CAA TGT CCC AAT CTC CCA AG, *Neo* 上游引物: GCT GCG AAT CGG GAG CGG CGA TAC, $CD38$ 和 *Neo* 共用下游引物: AAA GGG GAG AAC AGG AAG GA), 并通过 PCR 方法扩增 $CD38$ 基因和 *Neo* 基因片段, PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后, 用 ChampGelTM 5000 全自动凝胶成像分析系统进行扫描分析。

1.5 脾脏 B 细胞的磁珠阴选 分别取 WT 和 $CD38^{-/-}$ 小鼠脾脏, 用 100 μ m 的细胞筛网进行研磨, 获得单细胞悬液并对细胞进行计数, 经 ACK 红细胞裂解液处理裂解红细胞后, 稀释至细胞密度 1×10^8 /mL, 依次与 MagniSortTM 富集抗体混合液和 MagniSortTM 阴性选择磁珠进行孵育, 然后用 Magneto 分选器除去吸附了阴选磁珠的细胞, 即获得 B 细胞, 显微镜下直接进行计数。

1.6 流式细胞术鉴定脾脏 B 细胞的分选纯度 以分选前的脾脏 B 细胞做空白和单染, 将分选前的脾脏 B 细胞和阴选出的 B 细胞分别用 CD3e FITC 和 CD45R PE/Cy5.5 抗体染色后, 经流式细胞仪鉴定其 $CD3e^- CD45R^+$ 的 B 细胞纯度, 纯度 > 95% 为达标。

1.7 总 RNA 的提取及反转录 PCR 扩增相关基因的 cDNA 经磁珠阴选并通过流式细胞仪鉴定后的小鼠脾脏 B 细胞用 TRIzol 法提取 RNA, 用 Thermo NanoDrop 2000C 仪器检测 RNA 浓度及光密度 (D), 计算 D_{260}/D_{280} 的比值, 以 $1 \mu\text{g}$ RNA 为模板用 PrimeScript™ 反转录试剂盒反转录出 cDNA 并采用反转录 PCR 技术进行扩增。

1.8 实时定量 PCR 技术检测相关基因 mRNA 的表达水平 以 cDNA 为模板, 加入不同的引物 (*CD38* 上游引物: TGG TGT GGA CTG GAG AGC CTA C, 下游引物: GAG TGT AGA TGA GGC AGC GTC; *TNF- α* 上游引物: AGC CGA TGG GTT GTA CCT TG, 下游引物: GTG GGT GAG GAG CAC GTA GTC; *IL-1 β* 上游引物: TTT TCC TCC TTG CCT CTG AT, 下游引物: GAG TGC TGC CTA ATG TCC CC; *GAPDH* 上游引物: GAA GGT GGT GAA GCA GGC ATC, 下游引物: GTG GGA GTT GCT GTT GAA GTC G), 用 SYBR® Premix *Ex Taq* 扩增 WT 和 *CD38*^{-/-} 小鼠脾脏 B 细胞中的 *CD38* 基因及炎症因子 *TNF- α* 和 *IL-1 β* , 通过实时定量 PCR 仪进行定量扩增, 比较其表达水平的差异。

1.9 脾脏 B 细胞蛋白的提取及相关蛋白的蛋白质印迹法鉴定 经磁珠阴选并通过流式细胞仪鉴定后的小鼠脾脏 B 细胞用 RIPA 裂解法提取蛋白, 用 BCA 蛋白定量试剂盒进行定量后, 以 $30 \mu\text{g}$ 的样本量进行垂直电泳, 转膜后分别与一抗 SIRT1 (D1D7) 兔源单克隆抗体、*CD38* 鼠源单克隆抗体和 *GAPDH* 兔源多克隆抗体进行杂交孵育过夜, 第 2 天与相应的二抗进行杂交孵育, 经 ECL 化学发光试剂显色后, 用 MiniChemi™ 迷你型化学发光成像仪进行扫描分析。

1.10 统计学处理 应用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析, WT 和 *CD38*^{-/-} 小鼠脾脏中的 B 细胞数量、炎症因子及其相关基因的比较采用 *t* 检验。

检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 小鼠基因型的鉴定 小鼠尾巴 DNA 的 PCR 扩增结果显示: *CD38*^{-/-} 小鼠为纯合子敲除鼠, 与 WT 小鼠相比, 其 *Neo* 基因阳性, 而 *CD38* 基因为阴性。见图 1。

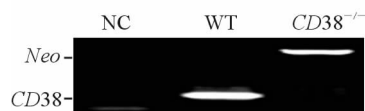


图 1 WT 和 *CD38*^{-/-} 小鼠的基因型鉴定

Fig 1 Identification of genotype of WT and *CD38*^{-/-} mice

NC: Negative control for PCR without template; WT: Wild-type; Neo: Neomycin

2.2 小鼠脾脏 B 细胞分选纯度的鉴定 小鼠脾脏 B 细胞经磁珠阴选后, 经 CD3e FITC 和 CD45R PE/Cy5.5 抗体染色后, 获得 *CD3e*⁻ *CD45R*⁺ 的 B 细胞纯度为 96.8%, 达到分选纯度要求 (>95%)。见图 2。

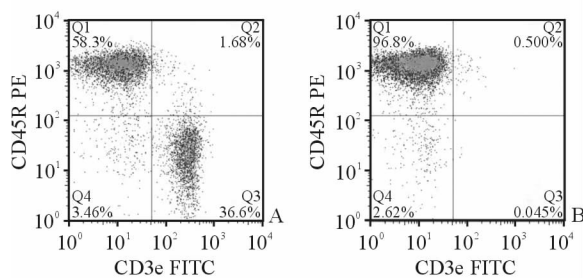


图 2 WT 小鼠脾脏 B 细胞的分选纯度

Fig 2 Sorting purity of WT murine spleen B-cells

A: Spleen cells before sorting; B: Spleen B-cells after sorting. WT: Wild-type

2.3 小鼠脾脏发育及细胞计数 与 WT 小鼠相比, *CD38*^{-/-} 小鼠脾脏的体积和质量降低 ($P < 0.01$, 图 3A、3B), 脾细胞总数 ($P < 0.01$, 图 3C) 及其 B 细胞数量 ($P < 0.01$, 图 3D) 均减少。

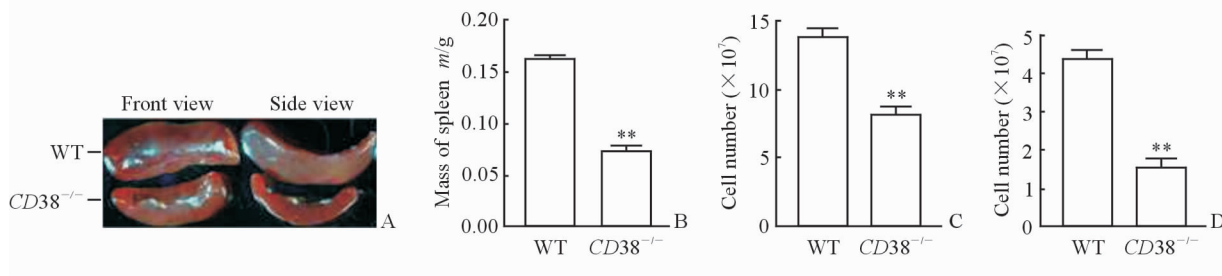


图 3 WT 和 *CD38*^{-/-} 小鼠脾脏发育及细胞数量的比较

Fig 3 Comparison of development of murine spleen and cell number between WT and *CD38*^{-/-} mice

A: Photograph of murine spleen; B: Mass of murine spleen; C: Number of murine spleen cells; D: Number of murine spleen B-cells. ** $P < 0.01$ vs WT (wild-type) group. $n=5$, $\bar{x} \pm s$

2.4 小鼠脾脏 B 细胞中炎症因子的表达 与 WT 小鼠相比, $CD38^{-/-}$ 小鼠脾脏 B 细胞中 $CD38$ mRNA 的表达水平下降 ($P < 0.01$), 伴炎症因子

$TNF-\alpha$ mRNA 和 $IL-1\beta$ mRNA 的表达水平也下降 ($P < 0.01$)。见图 4。

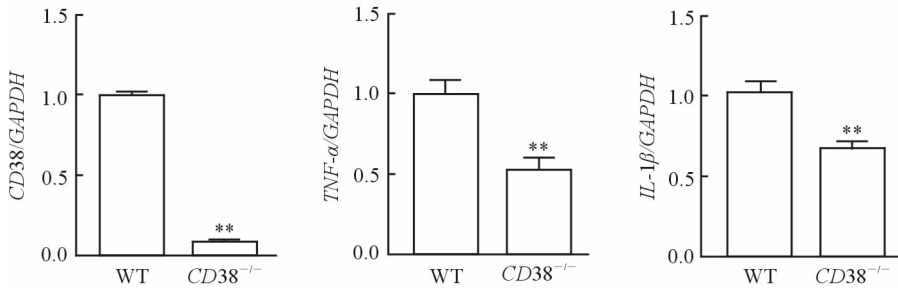


图 4 WT 和 $CD38^{-/-}$ 小鼠脾脏 B 细胞中 $CD38$ 及炎症因子 ($TNF-\alpha$ 和 $IL-1\beta$) mRNA 的表达

Fig 4 mRNA levels of $CD38$ and $TNF-\alpha$ and $IL-1\beta$ in murine spleen B-cells of WT and $CD38^{-/-}$ mice

$TNF-\alpha$: Tumor necrosis factor- α ; $IL-1\beta$: Interleukin-1 β ; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. ** $P < 0.01$ vs WT (wild-type) group. $n = 5, \bar{x} \pm s$

2.5 小鼠脾脏 B 细胞中 SIRT1 蛋白的表达 与 WT 小鼠相比, $CD38^{-/-}$ 小鼠脾脏 B 细胞中 $CD38$ 蛋白不表达, 但 SIRT1 蛋白表达水平上升 (1.60 ± 0.09 vs $1.00 \pm 0.04, P < 0.05$)。见图 5。

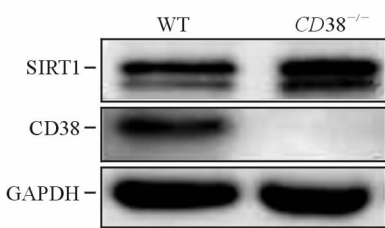


图 5 WT 和 $CD38^{-/-}$ 小鼠脾脏 B 细胞中 $CD38$ 及 SIRT1 蛋白的表达

Fig 5 Protein expression of $CD38$ and SIRT1 in murine spleen B-cells of WT and $CD38^{-/-}$ mice

WT: Wild-type; SIRT1: Sirtuin 1; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

3 讨论

B 细胞是免疫系统中的重要细胞, 在外源和内源信号的严密调控下, B 细胞最终分化为可合成和分泌免疫球蛋白的浆细胞, 执行机体的体液免疫^[8]; 成熟 B 细胞的主要功能是通过分泌抗体介导体液免疫, 还具有分泌细胞因子调节免疫应答的作用。CD38 是一个具有环化酶和水解酶作用, 相对分子质量为 42 000 的双功能跨膜糖蛋白, 可催化 NAD^+ 合成环腺苷二磷酸核糖 (cyclic ADP-ribose, cADPR), 也能水解 NAD^+ 或 cADPR 成 ADPR (ADP-ribose); CD38 分布于几乎所有的哺乳类细胞的包膜上, 在多种疾病中起广泛调节作用, 在慢性粒细胞

白血病患者外周血单核细胞中 CD38 升高是预后不良的重要指标^[9]。CD38 在免疫系统中的作用少见报道, 现有研究表明 $CD38^{-/-}$ 小鼠表现出巨噬细胞、中性粒细胞功能障碍, 树突状细胞 (dendritic cell, DC) 的抗原提呈能力下降, 脾脏中 B 细胞发育障碍^[5], 且常与不良预后相伴。本研究发现 $CD38^{-/-}$ 小鼠脾脏体积和质量显著降低, 脾细胞总数及其中的 B 细胞数量均减少 ($P < 0.01$), 表明 $CD38$ 基因敲除会影响小鼠脾脏的发育并导致 B 淋巴细胞减少。Rodríguez-Alba 等^[5] 也报道 CD38 可通过激活 PI3K 途径促进 B 细胞的发育成熟。

炎症因子在淋巴细胞发育异常中发挥某种中介作用, 但不同情况下涉及的具体因子各不相同。Ueda 等^[7] 研究证实, $IL-6$ 直接影响多能祖细胞分化方向的选择, 使其偏向于髓系。Pieper 等^[8] 也报道, 阻断 $TNF-\alpha$ 家族的 $BAFF$ 基因或其受体可抑制 T 细胞的成熟。本研究发现 $CD38^{-/-}$ 小鼠脾脏 B 细胞中炎症因子 $TNF-\alpha$ mRNA 和 $IL-1\beta$ mRNA 表达水平下降 ($P < 0.01$), 表明 $CD38$ 基因敲除可抑制与脾脏 B 细胞发育相关的主要炎症因子 $TNF-\alpha$ 和 $IL-1\beta$ 的表达。

SIRT1 是一种以 NAD^+ 为底物的去乙酰化酶, 通过使其底物, 如组蛋白、p53、 $NF-\kappa B$ ^[6] 及 $FoxOs$ ^[10] 等去乙酰化, 调节多种细胞功能, 包括基因沉默、细胞代谢、分化和存活、细胞应激反应等。在不同的状态下, SIRT1 所扮演的角色不一样, 如 SIRT1 可使 p53 去乙酰化, 抑制 DNA 与 p53 的结合, 从而保护细胞逃避 p53 介导的凋亡; 也可通过抑制 $NF-\kappa B$ 的

转录活性来抑制 TNF- α 介导的凋亡^[6]。由于 CD38 和 SIRT1 都存在于细胞核, 因此 CD38 可通过调节 NAD⁺ 水平影响 SIRT1 的活性^[11]。目前对 SIRT1 的研究主要集中在肿瘤^[12]、炎症^[13]、肥胖^[14]、老年化^[15]、长寿及心血管疾病^[6]等方面, 而其在 B 细胞发育中的作用尚未见报道。本研究发现 CD38^{-/-} 小鼠脾脏 B 细胞中 SIRT1 蛋白表达水平上升 ($P < 0.05$), 这与 CD38 和 SIRT1 共用 NAD⁺ 底物相关。

综上所述, CD38 及 SIRT1 在 B 细胞的发育中均有重要作用, CD38 基因的缺失会引起 B 细胞的发育障碍, 同时伴 SIRT1 表达升高及与 B 细胞发育相关的主要炎症因子 TNF- α 和 IL-1 β 的表达下降。但 CD38 基因的缺失是否可通过激活 SIRT1 通路, 使 NF- κ B 去乙酰化, 以抑制脾脏 B 细胞中炎症因子 TNF- α 和 IL-1 β 的表达尚不清楚。因此, 进一步探讨 CD38 基因缺失在引起 B 淋巴细胞减少及抑制自身免疫性疾病中的潜在作用及其作用通路, 有助于拓宽我们对 CD38 及 SIRT1 功能的认识, 为探讨自身免疫性疾病防治的新靶点奠定理论基础。

[参考文献]

[1] DE WINDE C M, VEENBERGEN S, YOUNG K H, XU-MONETTE Z Y, WANG X X, XIA Y, et al. Tetraspanin CD38 protects against the development of B cell lymphoma[J]. *J Clin Invest*, 2016, 126: 653-666.

[2] HUANG Y, LI R, CHEN X, ZHUO Y, JIN R, QIAN X P, et al. Doxycycline up-regulates the expression of IL-6 and GM-CSF via MAPK/ERK and NF- κ B pathways in mouse thymic epithelial cells[J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11: 1143-1149.

[3] CHINI C C, GUERRICO A M, NIN V, CAMACHO-PEREIRA J, ESCANDE C, BARBOSA M T, et al. Targeting of NAD metabolism in pancreatic cancer cells: potential novel therapy for pancreatic tumors[J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20: 120-130.

[4] ESCANDE C, NIN V, PRICE N L, CAPELLINI V, GOMES A P, BARBOSA M T, et al. Flavonoid apigenin is an inhibitor of the NAD⁺ ase CD38: implications for cellular NAD⁺ metabolism, protein acetylation, and treatment of metabolic syndrome[J]. *Diabetes*, 2013, 62: 1084-1093.

[5] RODRÍGUEZ-ALBA J C, MORENO-GARCÍA M E,

SANDOVAL-MONTES C, ROSALES-GARCIA V H, SANTOS-ARGUMEDO L. CD38 induces differentiation of immature transitional 2 B lymphocytes in the spleen[J]. *Blood*, 2008, 111: 3644-3652.

[6] KONG S, YEUNG P, FANG D. The class III histone deacetylase Sirtuin 1 in immune suppression and its therapeutic potential in rheumatoid arthritis[J]. *J Genet Genomics*, 2013, 40: 347-354.

[7] UEDA Y, YANG K, FOSTER S J, KONDO M, KELSOE G. Inflammation controls B lymphopoiesis by regulating chemokine CXCL12 expression[J]. *J Exp Med*, 2004, 199: 47-58.

[8] PIEPER K, GRIMBACHER B, EIBEL H. B-cell biology and development[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2013, 131: 959-971.

[9] AYDIN S, ROSSI D, BERGUI L, D'ARENA G, FERRERO E, BONELLO L, et al. CD38 gene polymorphism and chronic lymphocytic leukemia: a role in transformation to Richter syndrome? [J]. *Blood*, 2008, 111: 5646-5653.

[10] BUHRMANN C, BUSCH F, SHAYAN P, SHAKIBAEI M. Sirtuin-1 (SIRT1) is required for promoting chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289: 22048-22062.

[11] XIONG S, SALAZAR G, PATRUSHEV N, ALEXANDER R W. FoxO1 mediates an autofeedback loop regulating SIRT1 expression[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286: 5289-5299.

[12] WANG J C, KAFEEL M I, AVEZBAKIYEV B, CHEN C, SUN Y, RATHNASABAPATHY C, et al. Histone deacetylase in chronic lymphocytic leukemia [J]. *Oncology*, 2011, 81: 325-329.

[13] YANG X, WANG Y, GAO G. High glucose induces rat mesangial cells proliferation and MCP-1 expression via ROS-mediated activation of NF- κ B pathway, which is inhibited by eleutheroside E [J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2016, 36: 152-157.

[14] YI P, PANG J, ALEXANDER J S, RIVERA C. The endotoxin/toll-like receptor-4 axis mediates gut microvascular dysfunction associated with post-prandial lipidemia[J]. *BMC physiol*, 2013, 13: 12.

[15] IMAI S, GUARENTE L. NAD⁺ and sirtuins in aging and disease[J]. *Trends Cell Biol*, 2014, 24: 464-471.