

# 沉默信息调节因子1调控胆固醇合成对大鼠视神经损伤后RGCs修复的作用机制

张燕<sup>1</sup>, 李红阳<sup>2</sup>, 曹咏梅<sup>3</sup>

作者单位:<sup>1</sup>(100700)中国北京市,北京军区总医院眼科;  
<sup>2</sup>(100853)中国北京市,中国人民解放军总医院眼科;  
<sup>3</sup>(010065)中国内蒙古自治区呼和浩特市,内蒙古国际蒙医医院眼科

作者简介:张燕,女,在职博士研究生,副主任医师,主任,研究方向:神经眼科、眼部整形、眼表疾病、小儿斜弱视。

通讯作者:张燕. iamyanzi\_1972@126.com

收稿日期:2014-05-31 修回日期:2014-08-25

## Effect of SIRT1 regulating cholesterol synthesis in repairing retinal ganglion cells after optic nerve injury in rats

Yan Zhang<sup>1</sup>, Hong-Yang Li<sup>2</sup>, Yong-Mei Cao<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, Beijing Military General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100700, China; <sup>2</sup>Department of Ophthalmology, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China; <sup>3</sup>Department of Ophthalmology, International Inner Mongolian Hospital, Hohhot of Inner Mongolia, Hohhot 010065, Inner Mongolia Autonomous Region, China

**Correspondence to:** Yan Zhang. Department of Ophthalmology, Beijing Military General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100700, China. iamyanzi\_1972@126.com

Received:2014-05-31 Accepted:2014-08-25

### Abstract

• **AIM:** To investigate the repair mechanism associated with cholesterol synthesis regulated by silent information regulator 1 (SIRT1) in rat model of optic nerve damage.

• **METHODS:** Preparation of optic nerve damage in 70 rats was randomly divided into normal group (10 rats), resveratrol treatment group (experimental group 30 rats) and PBS buffer control group (30 rats). The experimental group and control group was further divided into 3 subgroups (each group 10 rats), respectively. After 7, 14, 21d injected resveratrol or PBS, optic nerve injury were observed, then the rats were sacrificed. Retina was segregated; the surviving retinal ganglion cell (RGCs) was counted. Dissection of optic nerve, cholesterol content of them were tested; RT-PCR was used to detect mRNA expression of SIRT1, SREBP2 and HMGCR; Western blot assay was used to test the protein expression levels of SIRT1, cholesterol regulatory element binding protein 2 (SREBP2) and HMGCR.

• **RESULTS:** The numbers of RGCs and cholesterol levels of rat model with optic nerve injury decreased significantly

( $P < 0.01$ ). The mRNA and protein expression levels of SIRT1, SREBP2 and HMGCR were all decreased in a time-dependent manner ( $P < 0.05$ ). Three components of the three time points, with time injuries were aggravated, and the extent of damage was significantly reduced in the treatment group compared with the control group. But in resveratrol treatment group, the cholesterol levels and mRNA or protein expression of SIRT1, SREBP2, HMGCR in optic nerve were significantly restored in a time-dependent ( $P < 0.05$ ). The number of surviving RGCs restored significantly in resveratrol treatment group ( $P < 0.01$ ) in a time-dependent manner.

• **CONCLUSION:** Up-regulating the expression of SIRT1, SREBP2 and down-regulating HMGCR by resveratrol could repair the injury of optic nerve through promoting the synthesis of cholesterol in neurons and retinal ganglion cells in the repair process. SIRT1 may be as a promising new target for treatment on optic nerve damage.

• **KEYWORDS:** silent information regulator 1; cholesterol regulatory element binding protein 2; cholesterol synthesis; optic nerve injury; retinal ganglion cells

**Citation:** Zhang Y, Li HY, Cao YM. Effect of SIRT1 regulating cholesterol synthesis in repairing retinal ganglion cells after optic nerve injury in rats. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2014; 14 (10):1760-1764

### 摘要

**目的:**探讨沉默信息调节因子1 (silent information regulator 1, SIRT1)调控胆固醇合成在视神经损伤修复中的作用机制。

**方法:**制备视神经损伤的大鼠模型,随机数字法将70只大鼠分为正常组10只,白藜芦醇治疗组(实验组)30只和PBS缓冲液对照组(对照组)30只;再将实验组和对照组分别分为三组,每组各10只;将白藜芦醇或PBS分别注射实验组和对照组大鼠,观察视神经损伤后第7, 14, 21d处死大鼠。分离视网膜,观察各组大鼠视网膜神经节细胞(retinal ganglion cell, RGCs)的存活数量。分离术眼视神经,检测其胆固醇含量;RT-PCR法检测SIRT1、SREBP2和HMGCR的mRNA表达水平;Western blot法检测SIRT1、SREBP2和HMGCR蛋白表达水平。

**结果:**损伤模型大鼠的视网膜RGCs的存活数量以及视神经胆固醇含量均明显减少( $P < 0.01$ );SIRT1、SREBP2和HMGCR的mRNA和蛋白表达水平均下降( $P < 0.05$ ),并呈时间依赖关系。三组分三个时间点,随时间延长损伤均加重,而治疗组损伤程度较对照组明显减弱。而白

黎芦醇治疗组的视神经胆固醇含量以及 SIRT1、SREBP2、HMGCR 的 mRNA 和蛋白表达水平, RGCs 存活数量均明显回升 ( $P < 0.01$ ), 且呈时间依赖关系。

**结论:** 白黎芦醇通过上调 SIRT1、SREBP-2 及其下游调控基因 HMGCR 的表达, 从而进一步促进神经元细胞的胆固醇合成以及视网膜神经节细胞的损伤后修复过程。

**关键词:** 沉默信息调节因子 1; 胆固醇调节元件结合蛋白 2; 胆固醇合成; 视神经损伤; 视网膜神经节细胞

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2014.10.05

**引用:** 张燕, 李红阳, 曹咏梅. 沉默信息调节因子 1 调控胆固醇合成对大鼠视神经损伤后 RGCs 修复的作用机制. 国际眼科杂志 2014;14(10):1760-1764

## 0 引言

由于解剖结构和生理学特点, 90% 以上的视神经损伤是视神经管段的间接性损伤<sup>[1]</sup>, 而直接性损伤以及视神经其它部位的损伤在临床上比较少见<sup>[2]</sup>。间接性视神经损伤是由于额面部特别是眉弓颞上部受到撞击而产生的, 伤侧眼局部和眼底可无异常表现; 受伤当时或以后发生视力下降甚至失明<sup>[3]</sup>。近年来相关研究发现, 存在诸多因素可以明确影响视神经 (optic nerve, ON) 的再生功能。以中枢神经系统损伤模型为基础的研究提示, 视神经可能再生, 这就为神经系统相关疾病的治疗提供了研究目标和方向<sup>[4]</sup>。神经元死亡、神经损伤和退行性变是神经系统疾病的常见现象, 均与神经元细胞脂代谢紊乱密切相关<sup>[5]</sup>。沉默信息调节因子 1 (silent information regulator 1, SIRT1) 在进化中高度保守, 对调节脂代谢关键基因起着至关重要的作用<sup>[6]</sup>。本研究旨在探讨 SIRT1 调控胆固醇合成在视神经损伤修复中的作用机制。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 大鼠视神经损伤模型制备: 成年 SD 雄性大鼠 70 只, 体质量 280 ~ 320g, 外眼及眼底检查均正常。使用随机数字表法将其分组, 即正常组 10 只, 白黎芦醇治疗组 (实验组) 和 PBS 缓冲液对照组 (对照组) 各 30 只; 实验组和对照组再各分为三组每组 10 只。模型制备及治疗处理: 50mg/kg 氯胺酮腹腔注射麻醉后, 充分暴露视神经, 用反向镊在距大鼠视神经球侧端 0.5 ~ 1.0mm 处夹持视神经, 造成大鼠视神经不完全性损伤。实验组在损伤术后立即向腹腔内注射白黎芦醇 (30mg/kg), 每 12h 一次; 对照组则按同样方法注入等体积 PBS, 分别于治疗后第 7, 14, 21d 各组分别处死 10 只大鼠, 取眼球后分别分离视神经和视网膜。

### 1.2 方法

**1.2.1 视网膜形态学观察和 RGCs 计数** 新鲜眼球, 常规乙醇脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 纵向视网膜全层切片, 厚 5 $\mu$ m, HE 染色, 中性树脂封片, 光镜下观察视网膜结构, 采用图像分析系统测量 RGCs 数量。

**1.2.2 细胞胆固醇含量测定** 待测细胞胆固醇含量用氧化酶-过氧化物酶法测定。按照试剂盒说明书, 将前述待测液 (分离的视网膜加入 PBS 后经匀浆制备成混悬待测液) 10 $\mu$ L 加入到体积为 1mL 的工作液 (酶试剂和缓冲液等级体积混合) 中, 37 $^{\circ}$ C 水浴反应 10min, 然后在分光光度计 500nm 波长下分别测定标准管 (标准 A) 及样品管的吸光度值 (测定 A), 按以下公式计算出每 10g 细胞蛋白

胆固醇含量: 胆固醇 (mg/10g 细胞蛋白) = (测定 A  $\div$  标准 A  $\times$  标准液浓度  $\times$  150  $\div$  样品重量)  $\times$  10。

**1.2.3 实时荧光定量 PCR 检测** 提取视神经组织的总 RNA, 以 M-MLV 逆转录酶法逆转录为 cDNA, 做为 RT-PCR 的模板。以  $\beta$ -actin 做为内参标准。根据 Genebank 查到鼠的 SIRT1、SREBP2 和 HMGCR 的 mRNA 序列, Roche 在线软件设计引物。采用 Applied Biosystems 公司相关检测试剂及已合成的各基因序列的引物, 在 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪上进行各基因的定量检测, 每个样本重复 3 次。20 $\mu$ L 反应体系包括: TaqMan MicroRNA Assays (20 $\times$ ) 1 $\mu$ L, cDNA 1.33 $\mu$ L, TaqMan 2 $\times$ Universal PCR Master Mix (No AmpErase UNG) 10 $\mu$ L, Nuclease-free water 7.67 $\mu$ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 10min; 40 个 PCR 循环 (95 $^{\circ}$ C 15s; 58 $^{\circ}$ C 60s)。扩增反应条件依据 Roche 在线软件设计引物所得的相应条件, 扩增实验和数据分析采取 ABI 7500 及相应分析软件。扩增反应获得的定量数值以  $\bar{x} \pm s$  表示, 全部实验均重复 3 次以上, 组间数值变量比较采用方差分析。

**1.2.4 Western blot** 所分离视神经采用裂解液进行充分裂解后, 将所得的样品置于 10% SDS-PAGE 凝胶电泳, 随后转移至 PVDF 膜。分别与兔多克隆抗 SIRT1 抗体 (1:500)、抗 SREBP2 抗体 (1:1000) 以及抗 HMGCR (1:1000) 于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。洗膜后二抗孵育 1h 后, ECL 化学发光法显示结果。

统计学分析: 全部实验重复至少 3 次以上 (重复 3 次以上的实验是指 RT-PCR、WB 等具体实验)。采用统计学软件 SPSS 13.0。数值均以  $\bar{x} \pm s$  表示。使用 ANOVA 进行统计比较, 随后使用 LSD 检验进行 Post-Hoc 检测, 组间数值变量比较采用方差分析。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 大鼠视神经不完全损伤模型建立** 术后实验大鼠切口愈合良好, 无炎症反应。角膜透明, 无外伤性白内障发生。术眼玻璃体无炎症反应, 玻璃体腔无积血。视网膜血液供应正常, 无出血和视网膜脱离发生。术眼瞳孔散大, 直径 2 ~ 4mm。直接对光反射 (-), 间接对光反射 (+) 即相对性传入性瞳孔反应障碍 (relative afferent papillary defect, RAPD), 各项评价指标反映该模型建立成功。

**2.2 视网膜形态学改变** 正常对照组视网膜由内向外分为神经节细胞层、内核层和外核层, 各层平行致密排列。视神经损伤后 7d, 对照组可见神经节细胞层胞核散乱分布, 体积缩小, 核染色质浓集, 内核层及外核层变薄, 细胞排列紊乱; 而实验组视网膜结构无明显变化。14d 后, 对照组胞核数目明显减少, 稀疏排列, 浓缩核多见, 内核层及外核层明显变薄; 而实验组大而浅染的神经节细胞核减少, 染色质浓集明显。21d 后, 对照组各层细胞数目明显减少, 神经节细胞层胞核稀少, 染色质浓集, 空化节细胞及胶质细胞浸润, 内、外核层细胞减少; 而实验组损伤程度相对较轻。白黎芦醇处理后各组相应的病变均有不同程度的改善, 而且存在时间依赖关系 (图 1)。

**2.3 RGCs 细胞数量变化** 损伤模型大鼠的视网膜 RGCs 细胞的存活数量, 在各时间点都较正常组明显减少 ( $P < 0.01$ ), 并呈时间依赖关系。而实验组与正常组比较, 在各时间点较正常组略减少 ( $P < 0.05$ ), 也呈时间依



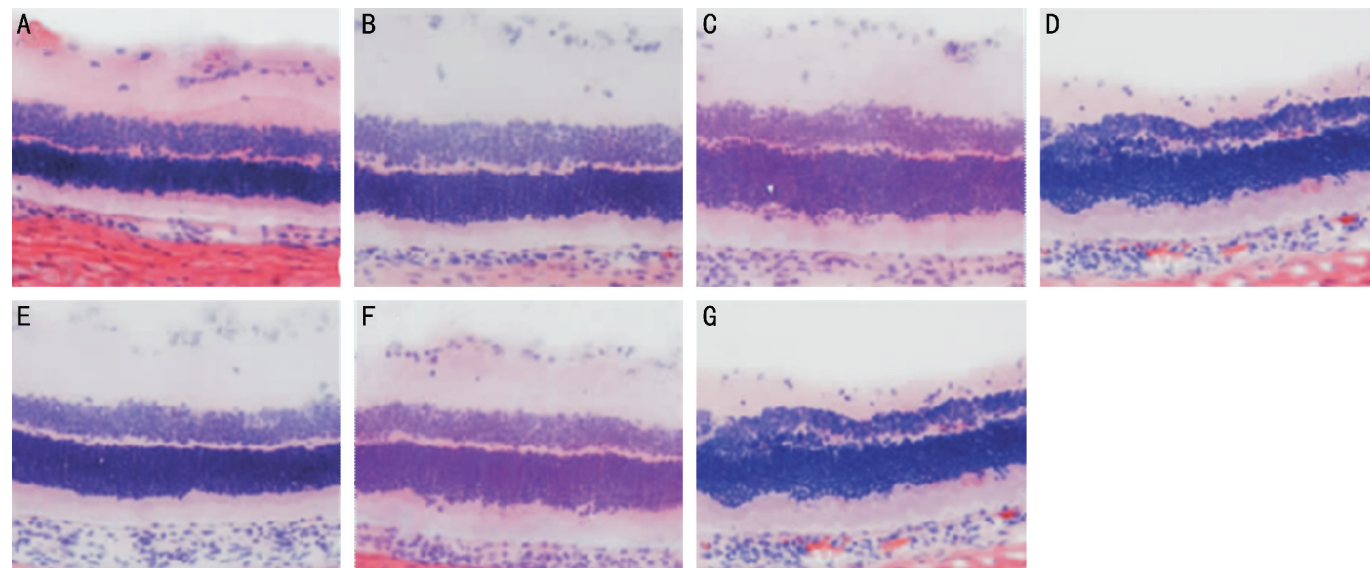


图1 鼠视网膜 HE 染色( $\times 400$ ) A:正常对照组; B:PBS 处理 7d 组; C:PBS 处理 14d 组; D:PBS 处理 21d 组; E:白藜芦醇处理 7d 组; F:白藜芦醇处理 14d 组; G:白藜芦醇处理 21d 组。

赖关系。而实验组较对照组在各时间点均存在显著的统计学差异( $P < 0.01$ ),说明白藜芦醇治疗可恢复大鼠视神经损伤模型中视网膜 RGCs 细胞的存活数量,且呈时间依赖关系,详见表 1。

**2.4 RGCs 细胞胆固醇含量变化** 损伤模型大鼠的视网膜 RGCs 细胞的胆固醇含量,在各时间点都较正常组明显减少( $P < 0.01$ ),并呈时间依赖关系。而实验组与正常组比较,在各时间点较正常组略减少( $P < 0.05$ ),也呈时间依赖关系。而实验组较对照组在各时间点均存在显著的统计学差异( $P < 0.01$ ),说明白藜芦醇治疗可恢复大鼠视神经损伤模型中视网膜 RGCs 细胞的胆固醇含量,且呈时间依赖关系,详见表 2。

**2.5 RT-PCR 检测 SIRT1、SREBP2 和 HMGCR 的 mRNA 表达水平变化** 损伤模型大鼠的视神经中,SIRT1、SREBP2 和 HMGCR 的 mRNA 表达水平在各时间点都较正常组明显减少( $P < 0.01$ ),并呈时间依赖关系。而实验组与正常组比较,在各时间点较正常组略减少( $P < 0.05$ ),也呈时间依赖关系。而实验组较对照组 SIRT1、SREBP2 和 HMGCR 的 mRNA 表达水平在各时间点均存在显著的统计学差异( $P < 0.01$ ),说明白藜芦醇治疗可恢复大鼠视神经中 SIRT1(图 2)、SREBP2(图 3)和 HMGCR(图 4)的 mRNA 表达水平。

**2.6 Western blot 检测 SIRT1、SREBP2 和 HMGCR 蛋白表达水平变化** 损伤模型大鼠的视神经中,SIRT1、SREBP2 和 HMGCR 的蛋白表达水平在各时间点都较正常组减少,并呈时间依赖关系。而实验组与正常组比较,在各时间点较正常组略减少,也呈时间依赖关系。而实验组较对照组 SIRT1、SREBP2 和 HMGCR 的蛋白表达水平在各时间点均存在差异,说明白藜芦醇治疗可恢复大鼠视神经中 SIRT1、SREBP2 和 HMGCR 的蛋白表达水平(图 5)。

### 3 讨论

随着颅脑创伤救治水平的提高,人们越来越重视颅脑创伤合并伤的治疗,以降低病死率和致残率,提高患者生活质量。创伤性视神经损伤(tramatic optic neuropathy,TON)在颅脑损伤患者中的发病率为 0.5%~5%,预后较差,是

表 1 各组不同时间点 RGCs 细胞的数量变化

( $\bar{x} \pm s$ , 个/显微镜视野)

组别	n	7d	14d	21d
正常组	10	33.18 $\pm$ 5.02		
实验组(治疗组)	30	29.46 $\pm$ 3.28 <sup>b</sup>	25.19 $\pm$ 2.54 <sup>b</sup>	22.66 $\pm$ 1.87 <sup>b</sup>
对照组	30	17.31 $\pm$ 3.18	14.55 $\pm$ 2.28	13.62 $\pm$ 2.88

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照组。

表 2 各组不同时间点 RGCs 细胞的胆固醇含量变化

( $\bar{x} \pm s$ , mg/10g 细胞蛋白)

组别	n	7d	14d	21d
正常组	10	102.26 $\pm$ 4.23		
实验组(治疗组)	30	87.54 $\pm$ 8.63 <sup>b</sup>	72.15 $\pm$ 6.38 <sup>b</sup>	64.38 $\pm$ 5.14 <sup>b</sup>
对照组	30	54.21 $\pm$ 4.67	43.59 $\pm$ 3.96	32.65 $\pm$ 3.12

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照组。

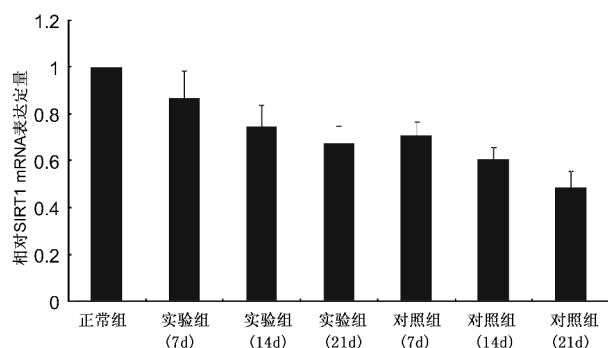


图 2 SIRT1 的 mRNA 表达水平 损伤模型大鼠的视神经中,SIRT1 的 mRNA 表达水平在各时间点(7d:0.71 $\pm$ 0.06;14d:0.61 $\pm$ 0.05;21d:0.49 $\pm$ 0.07)都较正常组(设为 1)明显减少( $P < 0.01$ )。而实验组与正常组比较,在各时间点(7d:0.87 $\pm$ 0.12;14d:0.75 $\pm$ 0.09;21d:0.68 $\pm$ 0.07)较正常组略减少( $P < 0.05$ )。而实验组较对照组在各时间点均存在显著统计学差异( $P < 0.01$ )。

颅脑外伤致残率较高的重要原因之一。创伤性视神经损伤的临床救治尚无统一的治疗规范,视神经损伤和再生的研究是当今医学界研究的热点和难点之一<sup>[7]</sup>。

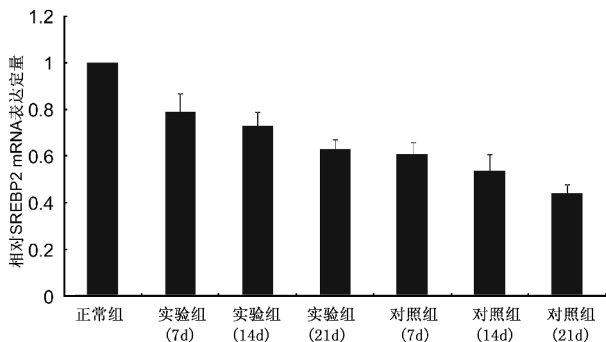


图3 SREBP2的mRNA表达水平 损伤模型大鼠的视神经中,SREBP2的mRNA表达水平在各时间点(7d:0.61±0.05;14d:0.53±0.06;21d:0.44±0.04)都较正常组(设为1)明显减少( $P<0.01$ )。而实验组与正常组比较,在各时间点(7d:0.79±0.08;14d:0.73±0.06;21d:0.63±0.04)较正常组略减少( $P<0.05$ )。而实验组较对照组在各时间点均存在显著的统计学差异( $P<0.01$ )。

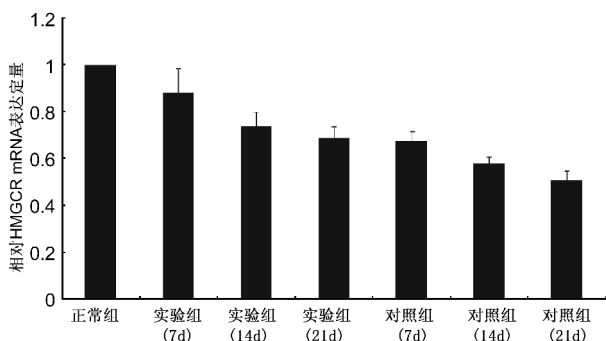


图4 HMGCR的mRNA表达水平 损伤模型大鼠的视神经中,HMGCR的mRNA表达水平在各时间点(7d:0.68±0.04;14d:0.58±0.03;21d:0.51±0.04)都较正常组(设为1)明显减少( $P<0.01$ )。而实验组与正常组比较,在各时间点(7d:0.88±0.11;14d:0.74±0.06;21d:0.69±0.05)较正常组略减少( $P<0.05$ )。而实验组较对照组在各时间点均存在显著的统计学差异( $P<0.01$ )。

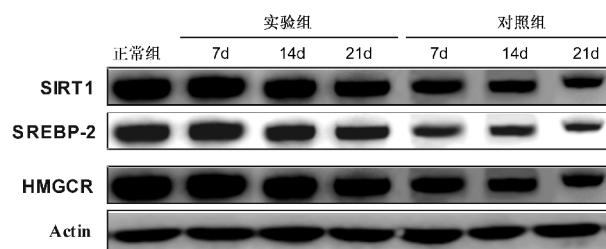


图5 Western blot检测SIRT1、SREBP2和HMGCR蛋白表达水平变化。

Sirtuins 或沉默信息调节蛋白 2 (Silencing information regulator 2, Sir 2) 是一类烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD<sup>+</sup>) 依赖型的组蛋白去乙酰化酶,该基因所在家族在进化中高度保守,与能量代谢、细胞氧化状态等密切相关,是长寿与衰老研究领域的热点基因。大量研究证实 Sirtuins 在基因沉默、DNA 损伤修复、有丝分裂调控及抗凋亡等方面起到了重要的作用<sup>[8]</sup>。去乙酰化酶 1 (SIRT1) 是一种用来修复受损 DNA 的酶,有研究发现该酶还可修复患有神经退行性疾病诸如阿尔兹海默症和肌萎缩侧索硬化症(又名“渐冻人”症,ALS)的小鼠体内的基因组不稳定性<sup>[9]</sup>。

与身体中其他细胞不同,成年哺乳动物大脑中的神经

元不会发生分裂。既然不能通过复制现有 DNA 来实现修复,那么 DNA 受损以及导致的基因组不稳定对神经元而言就是一种阻碍工作。而且,DNA 分子链的物理断裂与衰老和神经退行性疾病比如阿尔兹海默症和 ALS 患病情况下的认知下降也存在着联系<sup>[10]</sup>。已经明确去乙酰化酶可以防止大脑细胞凋亡,Li-Huei Tsai 等研究了这种保护行为的分子机制。他们发现,没有 SIRT1,神经元无法修复由有毒化学物质造成的 DNA 损伤<sup>[11-14]</sup>。此外,他们还发现 SIRT1 的行为受到另一种酶的控制调节——这种酶负责将 DNA 包裹进行压缩。该研究认为利用 SIRT1 激活药物治疗患有神经退行性疾病和阿尔兹海默症的小鼠的方法也能防止神经元发生 DNA 损伤<sup>[15-18]</sup>。

本实验研究发现,损伤模型大鼠的视网膜 RGCs 的存活数量以及视神经胆固醇含量均明显减少;同时 SIRT1、SREBP2 和 HMGCR 的 mRNA 和蛋白表达水平均下降,并呈时间依赖关系。应用 SIRT1 激动剂白藜芦醇治疗组的视神经胆固醇含量以及 SIRT1、SREBP2、HMGCR 的 mRNA 和蛋白表达水平,RGCs 存活数量均明显回升。SIRT1 激动剂白藜芦醇通过上调 SIRT1、SREBP-2 及其下游调控基因 HMGCR 的表达,可进一步促进神经元细胞的胆固醇合成以及视网膜神经节细胞的损伤后修复过程。

细胞能量代谢与其再生修复过程密切相关,其能量代谢三大方面之一即脂类物质代谢,其中胆固醇合成更为关键<sup>[19-21]</sup>。相关基因及调控机制对细胞的生物学功能有着极为重要的影响,本研究发现 SIRT1 激动剂白藜芦醇通过上调 SIRT1、SREBP2 及其下游调控基因 HMGCR 的表达,进一步促进神经元细胞的胆固醇合成。本研究首次全面阐释了 SIRT1 在神经元细胞的胆固醇合成过程中的重要功能性作用,以及对视网膜神经节细胞的损伤后修复过程中的关键性作用。SIRT1 通过调控其下游的 SREBP-胆固醇合成代谢通路,促进有利于神经元细胞修复的脂类物质(胆固醇)的合成。SIRT1 可能在视神经损伤后修复过程中起着至关重要的作用,其调控通路即 SIRT1-SREBP2-HMGCR 通路对细胞的相关生物学功能也尤为关键。

因此,我们认为 SIRT1 及其调控通路 SIRT1-SREBP2-HMGCR 可能用于视神经损伤修复重要的干预环节,而 SIRT1 可能是视神经损伤修复的治疗靶点。

#### 参考文献

- Vagefi MR, Seiff SR. Traumatic optic neuropathy. *Contemporary Ophthalmology* 2005;4(14):1-7
- Goldenberg - Cohen N, Miller NR, Repka MX. Traumatic optic neuropathy in children and adolescents. *J AAPOS* 2004; 8(1):20-27
- Levin LA, Baker RS. Management of traumatic optic neuropathy. *J Neuroophthalmol* 2003; 23(1):72-75
- Diez - Juan A, Andres V. Coordinate control of proliferation and migration by the p27Kip1/cyclin - dependent kinase/retinoblastoma pathway in vascular smooth muscle cells and fibroblasts. *Circ Res* 2003;92(4):402-410
- Mallawaarachchi CM, Weissberg PL, Siow RC. Smad7 gene transfer attenuates adventitial cell migration and vascular remodeling after balloon injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25(7):1383-1387
- Liu YR, Ye WL, Zeng XM, et al. K<sup>+</sup> channels and the cAMP - PKA pathway modulate TGF -  $\beta$ 1 induced migration of rat vascular myofibroblasts. *J Cell Physiol* 2008;216(3):835-843

- 7 Fujiwara M, Muragaki Y, Ooshima A. Upregulation of transforming growth factor- $\beta$ 1 and vascular endothelial growth factor in cultured keloid fibroblasts; relevance to angiogenic activity. *Arch Dermatol Res* 2005;297(4):161-169
- 8 Elbashir SM, Harborth I, Weber K, *et al.* Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* 2002;26(2):199-213
- 9 Sven W, Ulrich L, Djordje S, *et al.* Raloxifene improves endothelial dysfunction in hypertension reduced oxidase stress oxidative stress and enhanced nitric oxide production. *Circulation* 2002;105(17):2083-2091
- 10 Wassmann S, Laufs U, Muller K, *et al.* Cellular antioxidant effects of atorvastatin *in vitro* and *in vivo*. *Arterioscler Thromb Vase Biol* 2002;22(2):300-305
- 11 Groemping Y, Rittinger K. Activation and assembly of the NADPH oxidase; a structural perspective. *Biochem J* 2005;386(pt3):401-416
- 12 Gerasimovskaya EV, Ahmad S, White CW, *et al.* Extracellular ATP is an autocrine/placrine regulator of hypoxia induced adventitial fibroblast growth. Signaling through extra-cellular signal-regulated kinase-1/2 and the Egr-1 transcription factor. *J Biol Chem* 2002;277(47):44638-44650
- 13 Desmouliere A, Chaponnier C, Gabbiani G. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair Regen* 2005;13(1):7-12
- 14 Hou X, Xu S, Maitland-Toolan KA, *et al.* SIRT1 regulates hepatocyte lipid metabolism through activating AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 2008;283(29):20015-20026
- 15 Qi L, Shao J. SIRT1 regulates adiponeetin gene expression through Foxo1-C/enhancer-binding protein alpha transcriptional complex. *J Biol Chem* 2006;281(52):39915-39924
- 16 Feige JN, Lagouge M, Canto C, *et al.* Specific SIRT1 activation mimics low energy levels and protects against diet-induced metabolic disorders by enhancing fat oxidation. *Cell Metab* 2008;8(5):347-358
- 17 You M, Liang X, Ajmo JM, *et al.* Involvement of mammalian sirtuin 1 in the action of ethanol in the liver. *J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;294(4):G892-G898
- 18 Hou X, Xu S, Maitland-Toolan KA, *et al.* SIRT1 regulates hepatocyte lipid metabolism through activating AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 2008;283(29):20015-20026
- 19 Qiao L, Shao J. SIRT1 regulates adiponeetin gene expression through Foxo1-C/enhancer-binding protein alpha transcriptional complex. *J Biol Chem* 2006;281(52):39915-39924
- 20 Efion DM, Yonemitsu S, Nie Y, *et al.* SirT1 knockdown in liver decreases basal hepatic glucose production and increases hepatic insulin responsiveness in diabetic rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106(27):11288-11293
- 21 Dobbin MM, Madabhushi R, Pan L, *et al.* SIRT1 collaborates with ATM and HDAC1 to maintain genomic stability in neurons. *Nature neuroscience* 2013;16(8):10008-10015