

## 靶向端粒酶反转录酶基因短发夹RNA载体的构建

宋 扬<sup>1</sup>, 徐 韬<sup>1</sup>, 杨明坤<sup>2</sup>, 盛伟斌<sup>1</sup> (<sup>1</sup>新疆医科大学第一附属医院脊柱外科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054; <sup>2</sup>四川省巴中市中心医院骨科, 四川省巴中市 636600)

### 文章亮点:

实验在查询得到端粒酶反转录酶基因核苷酸序列后,参照了 shRNA 的设计原则设计并合成 2 条端粒酶反转录酶基因表达的干扰序列和一条对照序列,分别克隆连接到 pLentilox3.7.U6 载体上,应大鼠脊髓星形胶质细胞模型,通过 western blot 和免疫荧光检测验证所构建的 shRNA 干扰分子表达载体抑制端粒酶反转录酶基因表达的作用,筛选出干扰效果最好的质粒组,为之后的病毒载体包装奠定基础。

### 关键词:

组织构建; 组织工程; RNA 干扰; 端粒酶; 端粒酶反转录酶; 质粒载体; 星形胶质细胞; 短发夹 RNA; 脊髓损伤; 胶质瘢痕; 国家自然科学基金

### 主题词:

转染; 基因表达; 细胞; 质粒; 脊髓损伤

### 基金资助:

国家自然科学基金资助项目(81060106)

### 摘要

**背景:** 端粒酶反转录酶对端粒酶活化起重要作用。

**目的:** 利用 pLentilox3.7.U6 载体构建靶向大鼠脊髓星形胶质细胞端粒酶反转录酶基因的短发夹 RNA 干扰分子表达载体并鉴定其作用。

**方法:** 选择端粒酶反转录酶基因上两段序列体外合成 RNA 干扰分子的正义链和反义链模板序列,经退火成互补双链,与线性化 pLentilox3.7.U6 载体连接、转化大肠杆菌和序列测定,应用蛋白质印迹和免疫荧光技术,在体外培养的大鼠脊髓星形胶质细胞模型上验证构建的干扰载体抑制端粒酶反转录酶基因表达的效果。

**结果与结论:** 蛋白质印迹和免疫荧光检测结果表明,重组质粒干扰组中星形胶质细胞端粒酶反转录酶均呈低表达。结果证实,实验成功构建了针对大鼠脊髓星形胶质细胞端粒酶反转录酶基因的短发夹 RNA 质粒表达载体,此载体能有效抑制体外培养的大鼠脊髓星形胶质细胞端粒酶反转录酶的表达。

宋扬, 徐韬, 杨明坤, 盛伟斌. 靶向端粒酶反转录酶基因短发夹 RNA 载体的构建[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(7):1057-1062.

## Construction of targeting short hairpin RNA plasmid vector expressing TERT gene

Song Yang<sup>1</sup>, Xu Tao<sup>1</sup>, Yang Ming-kun<sup>2</sup>, Sheng Wei-bin<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Department of Spinal Surgery, First Affiliated Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China; <sup>2</sup>Department of Orthopedics, Bazhong Central Hospital, Bazhong 636600, Sichuan Province, China)

### Abstract

**BACKGROUND:** Telomerase reverse transcriptase (TERT) plays an important role in telomerase activation.

**OBJECTIVE:** To construct the targeting short hairpin RNA plasmid vector expressing TERT gene from astrocytes by using pLentilox3.7.U6.

**METHODS:** By using two sequences from TERT gene, we synthesized sense and antisense strand template sequences of RNA interference molecular *in vitro*, and then obtained the complementary strands through annealing procedure. We connected the strands with pLentilox3.7.U6 that was sequenced and transfected into the *Escherichia coli*. In the end, we tested its effect of reducing the TERT gene expressing by using cultured astrocytes from rat spinal cord *in vitro* through western blot and immunofluorescence technique.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Western blot and immunofluorescence assay showed that, compared with the control group, the interference groups had a lower TERT expression in astrocytes. The targeting short hairpin RNA plasmid vector expressing TERT gene is useful to reduce the TERT gene expression. The targeting short hairpin RNA plasmid vector expressing TERT gene is valid for us to do the further test learning the mechanism of astrocytes in spinal cord injury.

**Subject headings:** transfection; gene expression; cells; plasmids; spinal cord injuries

**Funding:** the National Natural Science Foundation of China, No. 81060106

Song Y, Xu T, Yang MK, Sheng WB. Construction of targeting short hairpin RNA plasmid vector expressing TERT gene. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2014;18(7):1057-1062.

宋扬, 男, 1986 年生, 陕西省汉中市人, 汉族, 新疆医科大学第一附属医院脊柱外科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054

通讯作者: 盛伟斌, 博士, 教授, 主任医师, 新疆医科大学第一附属医院脊柱外科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.07.013  
[http://www.crter.org]

中图分类号:R318  
文献标识码:B  
文章编号:2095-4344  
(2014)07-01057-06  
稿件接受: 2013-12-07

Song Yang, Studying for master's degree, Department of Spinal Surgery, First Affiliated Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Corresponding author: Sheng Wei-bin, M.D., Professor, Chief physician, Department of Spinal Surgery, First Affiliated Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Accepted: 2013-12-07

## 0 引言 Introduction

端粒酶反转录酶是端粒酶的关键亚基, 是端粒酶活性的限速决定子<sup>[1]</sup>。其表达不仅与端粒酶的活性密切相关, 而且其水平上调是端粒酶被激活的关键步骤<sup>[2]</sup>。在许多细胞增生现象中, 发现端粒酶表达激活, 例如恶性肿瘤和胶质瘢痕的形成。通过抑制端粒酶反转录酶的表达达到阻碍端粒酶激活, 从而对细胞增生类疾病起到干预作用是近年来的研究热点。目前, 对细胞内特定基因实施干扰, 抑制其表达有多重手段, 其中RNA干扰(RNA interference, RNAi)是常用的方法, 已在基因治疗、基因功能检测等相关研究中得到了广泛的应用。然而, 通过RNAi技术构建靶向端粒酶反转录酶基因的短发夹RNA(small hairpin RNA, shRNA)质粒表达载体, 并成功抑制大鼠脊髓源星形胶质细胞端粒酶反转录酶基因表达的研究未见相关报道。

实验应用RNAi的方法, 采用含U6启动子的质粒载体pLentilox3.7., 构建针对SD大鼠脊髓星形胶质细胞内端粒酶反转录酶基因的shRNA重组表达载体, 应用western blot和免疫荧光技术验证其抑制端粒酶反转录酶表达作用, 以期探讨所构建的质粒载体的正确性和有效性, 筛选干扰效果好的质粒组, 为后续试验奠定基础。

## 1 材料和方法 Materials and methods

**设计:** 观察性实验。

**时间及地点:** 于2013年4至9月在新疆医科大学第一附属医院医学研究中心完成。

**材料**

**实验动物:** 健康清洁级雄性SD大鼠4只, 体质量(200±50) g, 由新疆医科大学医学动物实验中心提供, 动物许可证号: SYXK(新)2003-001。

实验对动物的处理方法符合中华人民共和国科学技术部颁发的《关于善待实验动物的指导性意见》<sup>[3]</sup>。

靶向端粒酶反转录酶基因的 shRNA 质粒表达载体的构建与鉴定的试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
质粒 pLentilox3.7.U6	广州 Cyagen 公司
星形胶质细胞及 DH5α	新医大一附院细胞研究所
Hpa I 和 Xho I 内切酶及 T <sub>4</sub> DNA 连接酶	日本 TaKaRa 公司
Triton X-100	上海生工公司
DNA 回收试剂盒和 FuGENE HD 转染试剂盒	瑞士 Roche 公司
质粒 DNA 纯化试剂盒	杭州 V-GENE 公司
兔抗大鼠端粒酶反转录酶抗体、山羊抗兔 HRP IgG、鼠抗 β-actin 单克隆抗体	美国 Santa Cruz 公司
BCA 试剂盒、ECL 化学发光检测试剂盒	北京华特生公司
荧光倒置显微镜	德国 Zeiss 公司
PCR 仪	美国 Agilent Stratagene 公司

**实验方法:**

**shRNA序列的设计与合成:** 根据pLentilox3.7.U6中U6启动子表达小干扰RNA的要求, 参照从GenBank中查询获得的大鼠端粒酶反转录酶基因核苷酸序列(序列号AY539718.1; 3 360 bp), 使用Ambion公司siRNA Target finder软件, 分别设计2条编码siRNA的DNA序列片段, 并命名为shRNA-端粒酶反转录酶1, shRNA-端粒酶反转录酶2。将任一编码siRNA的DNA序列片段的随机组合序列设计成阴性对照, shRNA-端粒酶反转录酶1打乱序列后进行重排, 命名为shRNA-control(表1)。连接干扰片段正向和反向序列并隔之以间隔序列, 分别在其两端加入Hpa I 和Xho I 内切酶作用位点。并对这些序列进行Blast分析以避免基因的同源性。由上海生工合成编码siRNA的DNA序列。

表 1 靶向大鼠端粒酶反转录酶基因的 shRNA 靶序列及对照序列  
Table 1 Short hairpin RNA target sequence of rat TERT gene and control sequence

名称	序列(5'-3')	GC 含量(%)	Loop
shRNA-端粒酶反转录酶 1	GCT AAA TCC CTC ATT CCT ACT	38.1	TCT CTT GAA
shRNA-端粒酶反转录酶 2	GCA GGT ATA CGG CTT TCT TCG	44.4	TCT CTT GAA
shRNA-Control	GAT CAC GCA CTC AGC TGA CTA	44.8	TCT CTT GAA

**shRNA 干扰分子表达载体的构建和鉴定:** 根据所设计的大鼠shRNA-端粒酶反转录酶序列, 化学合成正向和反向的DNA oligos并稀释至终浓度为100 μmol/L。将配制好的退火缓冲液重复混合, 短暂离心后放入PCR仪扩增。用Hpa I 和Xho I 内切酶双酶切pLentilox3.7载体(氨苄抗性)使其线性化。然后将酶切产物在1%琼脂糖凝胶上进行电泳分离, 利用胶回收试剂盒回收纯化后将质粒质量浓度调整为0.5 g/L。将线性化载体和退火扩增得到DNA片段在T<sub>4</sub>DNA 连接酶作用下, 加入连接酶Buffer 16 °C条件下持续连接16 h。将连接产物经热休克法转化DH5α感受态细胞, 37 °C条件下在氨苄抗性的固态培养基平板上培养大约16 h后, 平板上出现单个菌落。挑取多个菌落至氨苄抗性的培养基中培养后进行测序鉴定, 由上海生工公司完成。

**大鼠星形胶质细胞的分离纯化:** 参考比较以往分离培养大鼠星形胶质细胞的方法<sup>[4-5]</sup>, 实验取体质量(200±50) g的SD大鼠, 无菌条件下取出胸段脊髓组织显微镜下去除脊髓膜及血管, 分离并用胰酶消化脊髓组织。吹打、将细胞分散后离心, 弃去上清液; 加入培养基, 使细胞充分分离, 贴壁2 h以除去成纤维细胞。置于37 °C、体积分数5%CO<sub>2</sub>培养箱中以体积分数10%FBS的DMEM-F12培养基进行培养。生长8-10 d待细胞融合后, 置于37 °C摇床中, 按250 r/min作用14-16 h后, 收集贴壁细胞, 加入新鲜培养液继续培养, 即可获得较高纯度的星形胶质细胞。

### shRNA干扰分子表达载体转染大鼠脊髓星形胶质细胞

用无抗生素的体积分数15%DMEM将大鼠脊髓星形胶质细胞传入6孔板, 每孔接种 $5 \times 10^5$ 个细胞, 转入37℃, 体积分数5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养24 h(细胞浓度达80%–90%), 将经测序检测正确的shRNA干扰分子表达重组载体100 μL用质量浓度8 mg/L FuGENE HD转染试剂转染星形胶质细胞, 按说明书操作。转染时, 每组设置对照质粒, 感染细胞过夜后换用DMEM新鲜培养基(不含抗生素, 含FBS), 在37℃、体积分数5%CO<sub>2</sub>条件下孵育感染细胞至4 d后, 进行后续实验。

### Western blot 检测星形胶质细胞端粒酶反转录酶蛋白

**表达:** 在转染星形胶质细胞96 h后, 分别收集干扰组和对照组细胞, 用细胞裂解液分离获得总蛋白, 根据BCA试剂盒说明书中步骤进行实验, 测定蛋白浓度。SDS-PAGE电泳Western blot检测端粒酶反转录酶蛋白的表达, 用β-actin作为内参对照。具体操作: 室温条件下, 体积分数5%脱脂奶粉+TBST在摇床上封闭1 h。一抗杂交: 端粒酶反转录酶(1:200)、β-actin(1:10 000), 4℃孵育过夜。洗膜: TBST洗膜3次, 10 min/次。山羊抗兔-HRP二抗(1:2 000), 室温孵育1 h。同前法洗膜。ECL发光试剂盒法显影, 按说明书操作。最后, 定影、冲洗X射线胶片及对胶片进行扫描分析。

**星形胶质细胞端粒酶反转录酶的免疫荧光染色:** 待细胞株生长浓度至80%融合时, 弃去培养基, PBS冲洗细胞2次, 10 min/次, 室温下用质量浓度40 g/L多聚甲醛固定细胞15 min后PBS冲洗。在4℃条件下, 用体积分数0.1%Triton X-100透膜15 min; 室温下用体积分数4% BSA封闭细胞30 min; 按1:100的比例稀释端粒酶反转录酶一抗, 4℃冰箱中孵育过夜; PBS冲洗细胞3次, 按1:100的比例稀释抗端粒酶反转录酶的PE二抗(山羊抗兔-HRP), 37℃条件下放置1 h; 用PBS冲洗后在倒置荧光显微镜下观察图像并拍照。

**主要观察指标:** 重组端粒酶反转录酶-shRNA干扰分子表达载体序列; 蛋白印迹和免疫荧光分别对比shRNA-端粒酶反转录酶1、shRNA-端粒酶反转录酶2和shRNA-Control干扰端粒酶反转录酶表达的效果。

## 2 结果 Results

**2.1 shRNA干扰分子表达载体的鉴定** 阳性菌落经上海生工测序鉴定, 端粒酶反转录酶-shRNA干扰分子表达载体序列正确, 符合实验设计要求。

**2.2 星形胶质细胞端粒酶反转录酶蛋白表达抑制情况** 转染96 h后 Western blot检测显示转染shRNA-端粒酶反转录酶1、shRNA-端粒酶反转录酶2的星形胶质细胞中端粒酶反转录酶表达受到抑制, shRNA-Control组无表达变化(图1)。免疫荧光检测显示, 转染96 h后, 与shRNA-control相比, 荧光显微镜下可见shRNA-端粒酶反转录酶1、shRNA-端粒酶反转录酶2组的星形胶质细胞端粒酶反转

录酶荧光明显减弱, 发出暗红色荧光(图2)。

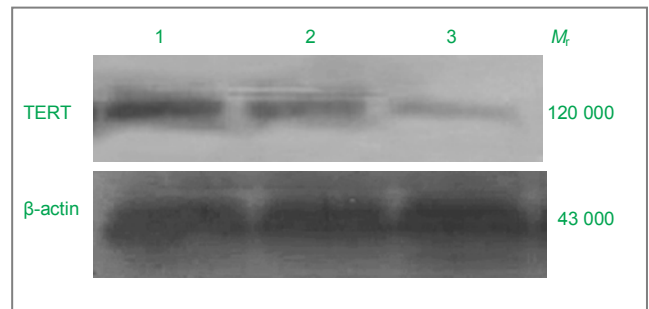


图1 重组质粒感染星形胶质细胞株96 h后细胞端粒酶反转录酶(TERT)蛋白的表达

Figure 1 Expression of telomerase reverse transcriptase (TERT) protein in recombinant plasmid-transfected astrocyte cell lines at 96 hours

图注: 1–3泳道: shRNA-control, shRNA-TERT2, shRNA-TERT1。shRNA-TERT2 转染大鼠星形胶质细胞后96 h, 细胞中TERT蛋白表达受到抑制, 而对对照组TERT蛋白无变化。

## 3 讨论 Discussion

目前认为, 脊髓损伤后由损伤区星形胶质细胞激活介导胶质瘢痕形成, 构成了阻碍再生的神经轴突通过损伤区的物理和化学屏障<sup>[6–8]</sup>, 是脊髓损伤后的标志性病理变化<sup>[9]</sup>。而星形胶质细胞激活增殖被发现与端粒酶的活化呈正相关线性关系<sup>[10]</sup>。端粒酶是一种核酸蛋白质复合物, 它是由互补于端粒DNA的RNA亚基(telomeraseRNA, TR)和具有反转录酶活性的端粒酶催化亚基端粒酶反转录酶及端粒酶相关蛋白(telomere associated protein 1, TP1)组成。其中端粒酶反转录酶的表达与端粒酶的活性密切相关, 是端粒酶被激活的关键步骤。因此作者设想通过抑制端粒酶激活的关键步骤即抑制端粒酶反转录酶亚基的表达来减少胶质瘢痕的形成。而端粒酶反转录酶表达调控主要表现在mRNA转录水平。目前, 抑制基因表达的方法主要包括反义技术、RNAi及核酶技术等。RNAi是一种在人体和动物体内普遍存在的基因调控方式, 也是近些年得到广泛应用的基因干扰阻断方法。其通过双链RNA分子在mRNA水平上抑制特定序列基因表达或者使其沉默, 主要在转录后水平上发挥调控抑制作用: 外源DNA或RNA引起细胞产生dsRNA, dsRNA由核酸内切酶作用裂解成21–23 nt的正义和反义序列组成的小分子干扰RNA片段(small interfering RNAs, siRNA)。siRNA的反义链形成一种有内切酶构成的复合体RISC。RISC利用其内切酶活性“切割”靶mRNA分子中与siRNA反义链互补的区域, 从而干扰基因表达。该技术手段方便人们简便、快捷、经济的从事基因表达抑制的相关研究, 在药物靶基因筛选、基因功能组学、细胞信号传导基因表达等的研究领域内得到广泛应用<sup>[11]</sup>。

李正伟等<sup>[12]</sup>通过构建靶向Rho基因的shRNA质粒表达载体有效抑制了Rho蛋白在少突胶质细胞内的表达的相关研究表明, 应用RNAi技术制作的干扰重组质粒可以获得有

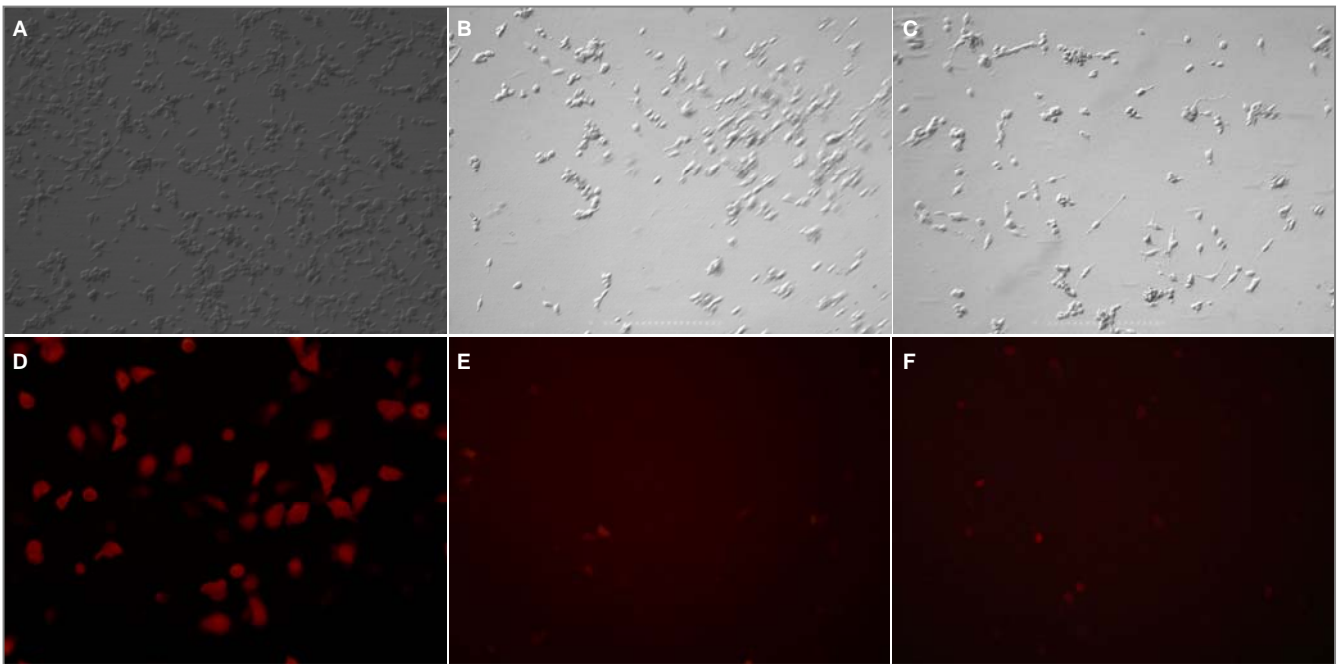


图 2 重组质粒感染星形胶质细胞株 96 h 后细胞端粒酶反转录酶(TERT)的表达

Figure 2 Expression of telomerase reverse transcriptase (TERT) in recombinant plasmid-transfected astrocyte cell lines at 96 hours

图注: 图中 A 为 shRNA-Control(光学显微镜); B 为 shRNA-TERT1(光学显微镜); C 为 shRNA-TERT2(光学显微镜); D 为 shRNA-Control(荧光显微镜); E 为 shRNA-TERT1(荧光显微镜); F 为 shRNA-TERT2(荧光显微镜)。图中光学显微镜(A-C)和荧光显微镜(D-E)下观察, 与对照组相比, shRNA-TERT1、shRNA-TERT2 组的星形胶质细胞端粒酶反转录酶呈低表达( $\times 200$ )。

目前关于端粒酶载体构建的文章如下(CNKI: 按发表时间排列):

文题	作者	来源	发表时间
应用 E1 区缺陷载体构建携带 SEA 基因的选择性腺病毒	胡建鹏, 韩从辉, 董秉正, 等	江苏大学学报(医学版)	2011-05-30
phTERT-tumstatin 载体构建及其抗血管形成	李倩倩	山西医科大学	2011-03-15
pbabe-gfp-hTERT 表达载体构建及在 B16 细胞中的表达	梁传宇, 吴丛梅	科协论坛(下半月)	2010-12-25
携带 TRAIL 基因的肿瘤靶向性腺病毒载体构建及其对肝癌的抑制效应	王毅刚	华东理工大学	2009-10-14
hTERT 基因启动子驱动 eGFP 的慢病毒载体构建及表达的初步研究	李军, 余松涛, 司维柯, 等	重庆医学	2009-09-30
重组 hTERT 启动子启动 CD 基因慢病毒载体构建及电穿孔法包装慢病毒颗粒	王星星	重庆大学	2009-04-01
MDA-7 基因的腺病毒载体构建及对肿瘤细胞凋亡的影响	王艳, 浦颖艳, 方琳, 等	江苏大学学报(医学版)	2008-05-30
hTERT-逆转录病毒载体构建及其在脐血间质干细胞中的表达	刘瑞敏, 李克, 邢莹	河南大学学报(医学版)	2008-05-30
MDA-7 基因的腺病毒载体构建及其肿瘤靶向治疗的实验研究	王艳	江苏大学	2008-04-01
hTERT-逆转录病毒载体构建及其介导的脐血间质干细胞基因转移研究	李克, 刘瑞敏, 韩雪飞, 邢莹	中国病理生理杂志	2008-02-15
hTERT 启动子调控的 p53 基因膀胱癌细胞靶向性表达载体构建及意义	符伟军, 史立新, 洪宝发, 等	军医进修学院学报	2006-08-30
抗端粒酶 M1RNA 核酶真核表达载体构建及肝癌细胞转染的研究	姜英俊, 程广, 孔心涓, 等	齐鲁医学杂志	2006-02-28
hTERT-逆转录病毒载体构建及其介导的脐血间充质干细胞基因转移研究	刘瑞敏	郑州大学	2005-05-10
hTERT 和 hIL-18 融合基因载体构建及真核细胞表达的研究	童向民, 金洁, 徐伟来, 等	中华医学会第八次全国血液学学术会议论文汇编	2004-11-01
用于癌症基因治疗的靶向载体构建和用途	郑晓飞, 杨义军, 朱捷, 等	中国人民解放军军事医学科学院放射医学研究所	2004-05-26
HBV 启动子调控的肝细胞高表达载体构建及抑癌作用研究	孙强玲	中国人民解放军军事医学科学院	2004-05-25
反义人类端粒酶 RNA 逆转录病毒载体构建及其对结肠直肠癌细胞的抑制作用	王智勇, 徐文怀, 田凤军, 等	中华胃肠外科杂志	2003-01-15
人端粒酶催化亚单位诱饵融合蛋白表达载体构建成功	周平, 陈兵, 刘为纹, 等	世界华人消化杂志	2001-10-15



## 目前关于端粒酶载体构建的文章如下(CNKI: 按主题排列):

文题	作者	来源	发表时间
抗端粒酶 M1RNA 核酶真核表达载体构建及肝癌细胞转染的研究	姜英俊, 程广, 孔心涓, 等	齐鲁医学杂志	2006-02-28
反义人类端粒酶 RNA 逆转录病毒载体构建及其对结直肠癌细胞的抑制作用	王智勇, 徐文怀, 田凤军, 等	中华胃肠外科杂志	2003-01-15
hTERT-逆转录病毒载体构建及其介导的脐血间充质干细胞基因转移研究	刘瑞敏	郑州大学	2005-05-10
人端粒酶催化亚单位诱饵融合蛋白表达载体构建成功	周平, 陈兵, 刘为纹, 等	世界华人消化杂志	2001-10-15
携带 TRAIL 基因的肿瘤靶向性腺相关病毒载体构建及其对肝癌的抑制效应	王毅刚	华东理工大学	2009-10-14
hTERT 基因启动子驱动 eGFP 的慢病毒载体构建及表达的初步研究	李军, 余松涛, 司维柯, 等	重庆医学	2009-09-30
hTERT-逆转录病毒载体构建及其介导的脐血间充质干细胞基因转移研究	李克, 刘瑞敏, 韩雪飞, 等	中国病理生理杂志	2008-02-15
hTERT 启动子调控的 p53 基因膀胱癌细胞靶向性表达载体构建及意义	符伟军, 史立新, 洪宝发, 等	军医进修学院学报	2006-08-30
应用 E1 区缺陷载体构建携带 SEA 基因的选择性腺病毒	胡建鹏, 韩从辉, 董秉正, 等	江苏大学学报(医学版)	2011-05-30
phTERT-tumstatin 载体构建及其抗血管形成	李倩倩	山西医科大学	2011-03-15
MDA-7 基因的腺病毒载体构建及其肿瘤靶向治疗的实验研究	王艳	江苏大学	2008-04-01
MDA-7 基因的腺病毒载体构建及对肿瘤细胞凋亡的影响	王艳, 浦颖艳, 方琳, 等	江苏大学学报(医学版)	2008-05-30
HBV 启动子调控的肝细胞高表达载体构建及抑癌作用研究	孙强玲	中国人民解放军军事医学科学院	2004-05-25
pbabe-gfp-hTERT 表达载体构建及在 B16 细胞中的表达	梁传宇, 吴丛梅	科协论坛(下半月)	2010-12-25
hTERT 和 hIL-18 融合基因载体构建及真核细胞表达的研究	童向民, 金洁, 徐伟来, 等	中华医学会第八次全国血液学学术会议论文汇编	2004-11-01
重组 hTERT 启动子启动 CD 基因慢病毒载体构建及电穿孔法包装慢病毒颗粒	王星星	重庆大学	2009-04-01
用于癌症基因治疗的靶向载体构建和用途	郑晓飞, 杨义军, 朱捷, 等	中国人民解放军军事医学科学院放射医学研究所	2004-05-26
hTERT-逆转录病毒载体构建及其在脐血间充质干细胞中的表达	刘瑞敏, 李克, 邢莹	河南大学学报(医学版)	2008-05-30

## 目前关于端粒酶载体构建的文章如下(CNKI: 按下载量排列):

文题	作者	来源	下载量
携带 TRAIL 基因的肿瘤靶向性腺相关病毒载体构建及其对肝癌的抑制效应	王毅刚	华东理工大学	181
hTERT-逆转录病毒载体构建及其介导的脐血间充质干细胞基因转移研究	李克, 刘瑞敏, 韩雪飞, 等	中国病理生理杂志	118
hTERT-逆转录病毒载体构建及其介导的脐血间充质干细胞基因转移研究	刘瑞敏	郑州大学	109
HBV 启动子调控的肝细胞高表达载体构建及抑癌作用研究	孙强玲	中国人民解放军军事医学科学院	109
hTERT 基因启动子驱动 eGFP 的慢病毒载体构建及表达的初步研究	李军, 余松涛, 司维柯, 等	重庆医学	106
重组 hTERT 启动子启动 CD 基因慢病毒载体构建及电穿孔法包装慢病毒颗粒	王星星	重庆大学	98
MDA-7 基因的腺病毒载体构建及对肿瘤细胞凋亡的影响	王艳, 浦颖艳, 方琳, 等	江苏大学学报(医学版)	86
抗端粒酶 M1RNA 核酶真核表达载体构建及肝癌细胞转染的研究	姜英俊, 程广, 孔心涓, 等	齐鲁医学杂志	77
pbabe-gfp-hTERT 表达载体构建及在 B16 细胞中的表达	梁传宇, 吴丛梅	科协论坛(下半月)	72
hTERT-逆转录病毒载体构建及其在脐血间充质干细胞中的表达	刘瑞敏, 李克, 邢莹	河南大学学报(医学版)	61
hTERT 启动子调控的 p53 基因膀胱癌细胞靶向性表达载体构建及意义	符伟军, 史立新, 洪宝发, 等	军医进修学院学报	57
反义人类端粒酶 RNA 逆转录病毒载体构建及其对结直肠癌细胞的抑制作用	王智勇, 徐文怀, 田凤军, 等	中华胃肠外科杂志	44
MDA-7 基因的腺病毒载体构建及其肿瘤靶向治疗的实验研究	王艳	江苏大学	43
phTERT-tumstatin 载体构建及其抗血管形成	李倩倩	山西医科大学	34
应用 E1 区缺陷载体构建携带 SEA 基因的选择性腺病毒	胡建鹏, 韩从辉, 董秉正, 等	江苏大学学报(医学版)	24
人端粒酶催化亚单位诱饵融合蛋白表达载体构建成功	周平, 陈兵, 刘为纹, 等	世界华人消化杂志	22
hTERT 和 hIL-18 融合基因载体构建及真核细胞表达的研究	童向民, 金洁, 徐伟来, 等	中华医学会第八次全国血液学学术会议论文汇编	4

效的干扰效果,这与本次实验所采用的技术手段类似,都是通过设计并合成靶基因干扰序列,并连接到适当载体上,通过Western blot检测质粒对目的基因表达的抑制效果。但是,由于质粒载体自身的局限性,比如其在细胞内持续作用能力不如病毒类载体稳定和有效,目前,常常作为病毒类载体设计合成的前期步骤,通过质粒载体转染大肠杆菌细胞来包装病毒类载体。赵鹏等<sup>[13]</sup>通过构建靶向端粒酶反转录酶基因的质粒载体包装反转录病毒感染胶质瘤细胞发现该载体可以有效抑制端粒酶反转录酶基因表达和端粒酶活性并减少胶质瘤的产生。谭挺等<sup>[14]</sup>的类似研究表明,通过设计靶基因序列构建质粒载体,继而包装病毒类载体实施RNAi是目前抑制基因表达的简便有效手段。但他们的研究缺乏对所构建的质粒的有效性进行检测和筛选,直接包装病毒类载体转染目的细胞实施靶基因抑制缺少对同一目的基因质粒载体干扰效果和病毒类载体干扰效果的纵向比较。

实验在查询得到GenBank中公布的端粒酶反转录酶基因核苷酸序列后,参照了shRNA的设计原则,设计并合两条端粒酶反转录酶基因表达的干扰序列和1条对照序列,分别克隆连接到pLentilox3.7.U6载体上,应用前期试验已经获得的体外培养的大鼠脊髓星形胶质细胞模型,通过western blot和免疫荧光检测验证所构建的shRNA干扰分子表达载体抑制端粒酶反转录酶基因表达的作用。筛选出干扰效果最好的质粒组,为随后的病毒载体包装奠定基础。载体将两条干扰序列转染入细胞内,形成各自的siRNA,后者形成的RISC复合体与端粒酶反转录酶目的基因配对后利用其内切酶活性“切割”目的基因,达到抑制其表达的作用。Western blot检测结果表明,与对照组相比,shRNA-端粒酶反转录酶1的抑制效果优于shRNA-端粒酶反转录酶2,这与相应的免疫荧光检测细胞内端粒酶反转录酶蛋白表达结果相互印证,可以认为shRNA-端粒酶反转录酶1组干扰效果最好。shRNA-端粒酶反转录酶1组干扰效果好的原因可能在于:与shRNA-端粒酶反转录酶2序列相比,随机设计的shRNA-端粒酶反转录酶1序列与端粒酶反转录酶 mRNA靶序列的配对程度更高,从而对目的基因产生更完全地破坏作用,从而抑制目的基因表达。

根据实验结果发现,靶向端粒酶反转录酶基因的shRNA质粒表达载体对于对大鼠脊髓源星形胶质细胞端粒酶反转录酶基因表达有抑制作用,随机设计的质粒组之间在干扰效果上存在差异,此分组设计有利于筛选干扰效果好的质粒包装病毒类载体。

**致谢:** 感谢新疆医科大学第一附属医院医学研究院为本次实验提供的科研条件。

**作者贡献:** 实验设计宋扬、徐韬和盛伟斌; 实验实施宋扬和徐韬; 实验评估和审核盛伟斌; 资料收集宋扬、徐韬和杨明坤;

文章撰写宋扬和徐韬; 宋扬对文章负责。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**伦理要求:** 实验对动物的处理方法符合中华人民共和国科学技术部颁发的《关于善待实验动物的指导性意见》。

**学术术语:** RNA干扰-是指由双链RNA诱发的、导致生物体内同源mRNA高效特异性降解的现象。由于使用RNA干扰技术可以特异性剔除或关闭特定基因的表达,所以该技术已被广泛用于探索基因功能及恶性肿瘤的基因治疗领域。

**作者声明:** 文章为原创作品,无抄袭剽窃,无泄密及署名和专利争议,内容及数据真实,文责自负。

#### 4 参考文献 References

- [1] Kirkpatrick KL, Mokbel K. The significance of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) in cancer. *Eur J Surg Oncol.* 2001;27(8):754-760.
- [2] Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in tetrahymena extracts. *Cell.* 1985;43(2 Pt 1):405-413.
- [3] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals. 2006-09-30.
- [4] 杨镭镭,王清秀,彭成为,等.大鼠脊髓星形胶质细胞的分离与纯化[J].解剖学杂志,2008,31(2):207-209.
- [5] 宋晓斌,杨智勇,邓兴力,等.星形胶质细胞瘤干细胞的体外分离,培养与鉴定[J].中国组织工程研究,2013,17(1):56-61.
- [6] Hobohm C, Gunther A, Grosche J, et al. Decomposition and long-lasting downregulation of extracellular matrix in perineuronal nets induced by focal cerebral ischemia in rats. *J Neurosci Res.* 2005;80(4):539-548.
- [7] Alonso G. NG2 proteoglycan-expressing cells of the adult rat brain: possible involvement in the formation of glial scar astrocytes following stab wound. *Glia.* 2005;49(3):318-338.
- [8] Kozuka N, Itofusa R, Kudo Y, et al. Lipopolysaccharide and proinflammatory cytokines require different astrocyte states to induce nitric oxide production. *J Neurosci Res.* 2005;82(5):717-728.
- [9] 周建军,吴国材,胡荣,等.大鼠实验性脊髓损伤后胶质瘢痕分布规律研究[J].中华实验外科杂志,2007,23:347-350.
- [10] Tao X, Ming-kun Y, Wei-bin S, et al. Role of telomerase reverse transcriptase in glial scar formation after spinal cord injury in rats. *Neurochem Res.* 2013;38(9):1914-1920.
- [11] Yu J Y, DeRuiter S L, Turner DL. RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(9):6047-6052.
- [12] 李正伟,白云深,任宪盛,等.靶向RhoA基因的shRNA质粒表达载体的构建与鉴定[J].中国老年学杂志,2009,29(2):164-166.
- [13] 赵鹏,傅震,尤永平,等.靶向人端粒酶反转录酶基因小片段干涉RNA慢病毒表达载体的构建与鉴定[J].中华医学遗传学杂志,2008,25(1):27-31.
- [14] 谭挺,胡志奇.pLEGFP-N1-端粒酶反转录酶载体的构建及其表达[J].中华实验外科杂志,2011,28(12):2108-2110.