

大鼠C-sis基因克隆及其真核表达载体的构建

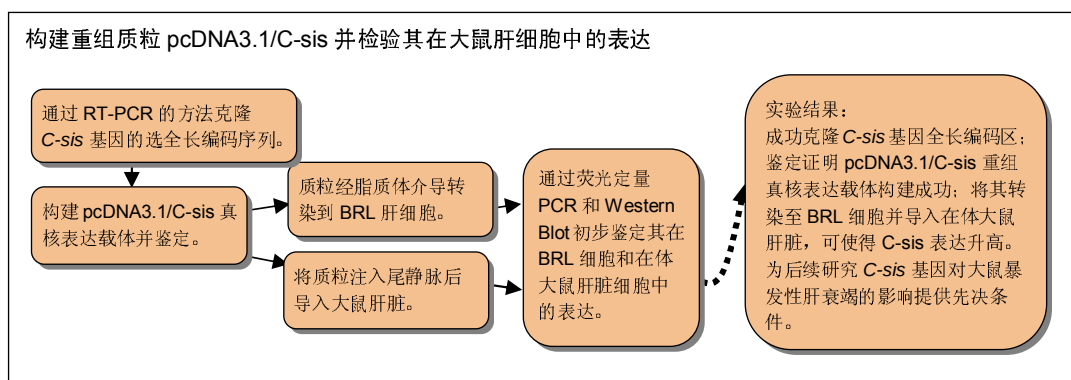
孙国芳¹, 丁浩²(南昌大学第二附属医院, ¹心电诊断室, ²消化内科, 江西省南昌市 330006)

引用本文: 孙国芳, 丁浩. 大鼠 C-sis 基因克隆及其真核表达载体的构建[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(49):7418-7424.

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2016.49.018

ORCID: 0000-0001-8793-9069(孙国芳)

文章快速阅读:



孙国芳, 女, 1982 年生, 山西省万荣县人, 汉族, 2011 年南昌大学医学院毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事心血管疾病的的基础研究。

通讯作者: 丁浩, 博士, 主治医师, 南昌大学第二附属医院消化内科, 江西省南昌市 330006

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2016)49-07418-07

稿件接受: 2016-10-13

文题释义:

基因克隆: 是 20 世纪 70 年代发展起来的一项具有革命性的研究技术, 可概括为分、切、连、转、选。

“切”是指用序列特异的限制性内切酶切开载体 DNA, 或者切出目的基因; “连”是指用 DNA 连接酶将目的 DNA 同载体 DNA 连接起来, 形成重组的 DNA 分子; “转”是指通过特殊的方法将重组的 DNA 分子送入宿主细胞中进行复制和扩增; “选”则是从宿主群体中挑选出携带有重组 DNA 分子的个体。

最终目的在于通过相应技术手段, 将目的基因导入宿主细胞, 在宿主细胞内目的基因被大量的复制。C-sis: 是血小板衍生生长因子 B 链的编码基因。C-sis 的基本功能是通过多种机制促使有丝分裂信号向胞内转导并促进细胞增殖。C-sis 编码的蛋白血小板衍生生长因子 B 是一种较强的促有丝分裂源和化学诱导剂, 可刺激间胚叶来源细胞的分裂、增殖, 对血管的再生及创伤愈合有良好的促进作用。故 C-sis 具有促进细胞增殖并抑制凋亡, 进而促进组织修复的功能。

摘要

背景: 原癌基因 C-sis 具有促进细胞增殖并抑制凋亡, 进而促进组织修复的功能。假设 C-sis 可能在受损肝组织的修复和暴发性肝衰竭的治疗中发挥积极作用。

目的: 构建 pcDNA3.1/C-sis 真核表达载体, 检测其在大鼠正常肝细胞株 BRL 细胞和在体大鼠肝脏细胞中的表达。

方法: 通过 RT-PCR 的方法克隆 C-sis 基因的选全长编码序列, 构建 pcDNA3.1/C-sis 真核表达载体。鉴定无误后经脂质体介导转染到 BRL 细胞中, 并通过将质粒注入尾静脉后导入大鼠肝脏。最后通过荧光定量 PCR 和 Western Blot 鉴定其在 BRL 细胞和在体大鼠肝脏细胞中的表达。

结果与结论: ①成功克隆了 C-sis 基因全长编码区; 测序证明 pcDNA3.1/C-sis 重组真核表达载体构建成功; ②将其转染至 BRL 细胞和在体大鼠肝脏, 可使 C-sis 表达升高; ③实验结果为后续研究 C-sis 基因对大鼠暴发性肝衰竭的影响提供了先决条件。

关键词:

实验动物; 基因病毒载体相关因子模型; 基因克隆; C-sis; 大鼠; 转染; 真核表达载体; 酶切; 脂质体; 鼠尾静脉; 国家自然科学基金

主题词:

动物, 模型; 基因; 脂质体; 转染; 组织工程

基金资助:

国家自然科学基金资助项目(81300348); 江西省青年科学基金资助项目(20151BAB215006); 江西省青年科学基金资助项目(20132BAB215015)

Sun Guo-fang, Master,
Attending physician,
Diagnosis Room of ECG,
the Second Affiliated
Hospital of Nanchang
University, Nanchang
330006, Jiangxi Province,
China

Corresponding author:
Ding Hao, M.D., Attending
physician, Department of
Gastroenterology, the
Second Affiliated Hospital
of Nanchang University,
Nanchang 330006, Jiangxi
Province, China

Cloning of rat C-sis gene and construction of its eukaryotic expression vector

Sun Guo-fang¹, Ding Hao² (¹Diagnosis Room of ECG, ²Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China)

Abstract

BACKGROUND: C-sis proto-oncogene can promote tissue repair by inducing cell proliferation and inhibiting cell apoptosis. Therefore, C-sis may play a positive role in the repair of damaged liver tissue and the treatment of fulminant hepatic failure.

OBJECTIVE: To construct pcDNA3.1/C-sis eukaryotic expression vector and detect its expression in BRL cells (the normal liver cells of rats) and rat liver cells *in vivo*.

METHODS: The full-length coding sequence of C-sis gene was cloned through real time-PCR. pcDNA3.1/C-sis eukaryotic expression vector was constructed and sequenced, followed by transfected into BRL cells using liposome and injected into the rat liver *via* tail vein. Finally, its expression in BRL cells and rat liver cells *in vivo* was identified by fluorescence quantitative PCR and western blotting.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) The full length of encoding region of C-sis gene was successfully cloned. Sequencing proved that pcDNA3.1/C-sis recombinant eukaryotic expression vector was constructed successfully. (2) The expression of C-sis was increased after transfected into BRL cells and rat liver. (3) These results provide basis for the subsequent study of the effect of C-sis gene on fulminant hepatic failure in rats.

Subject headings: Models, Animal; Genes; Liposomes; Transfection; Tissue Engineering

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81300348; the Science Foundation for the Youth of Jiangxi Province, No. 20151BAB215006, 20132BAB215015

Cite this article: Sun GF, Ding H. Cloning of rat C-sis gene and construction of its eukaryotic expression vector. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2016;20(49):7418-7424.

0 引言 Introduction

组织损伤和脏器衰竭的主要原因是细胞的过度死亡和/或生长受抑,原癌基因的应用有可能从根本上逆转器官功能的衰竭并达到组织修复的目的。原癌基因也被看成为对组织急性损伤具有立即反应的“即早基因”,原癌基因C-sis是血小板衍生生长因子B链的编码基因^[1]。有研究表明C-sis具有促进细胞增殖并抑制凋亡,进而促进组织修复的功能。因此可以假设C-sis可能在受损肝组织的修复和暴发性肝衰竭的治疗中发挥积极作用。

为研究C-sis基因对大鼠暴发性肝衰竭的影响,首先需构建大鼠C-sis基因的真核表达载体,即pcDNA3.1/C-sis。文章对构建大鼠C-sis基因的真核表达载体即pcDNA3.1/C-sis的过程进行阐述。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 实验材料 实验于2015年1至6月在南昌大学第二附属医院分子医学中心完成。空载质粒pcDNA3.1(+)和克隆菌株DH5 α 感受态细胞由实验室保存;大鼠正常肝细胞株BRL细胞购自上海中科院细胞库;琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒和质粒小量提取试剂盒购自Axygen公司;质粒中抽试剂盒OMEGA公司。分子生物学实验所用到的工具酶购自Fermentas公司;DNA分子量标准和蛋白低分子量标准购自捷瑞生物;引物合成由上海

Invitrogen生物公司完成。

1.2 实验动物 SD大鼠雌雄不限,均为3月龄 $\pm$ 15 d,由南昌大学医学院医学实验动物科学部提供,动物合格证为医动字021-0916。实验方案中有关动物伦理问题已经由南昌大学第二附属医院实验动物伦理委员会讨论批准。

1.3 造模方法

1.3.1 引物合成与测序及总RNA的抽提 利用primer premier 5.0设计一对引物,扩增片段大小为726 bp,引物序列如下:正向引物(L1): 5'-CGC GAA TTC ATG AAT CGC TGC TGG GC-3'(划线处为EcoRI酶切位点),反向引物(L2): 5'-CCC TCT AGA CTA GGC TCC AAG GAT CTC-3'(划线处为Xba I 酶切位点)。测序工作由南京金斯瑞公司完成。参照Invitrogen的Trizol试剂说明书从大鼠肝组织中提取总RNA,并反转录为cDNA,分装后于-20℃保存。

1.3.2 C-sis基因的PCR扩增 PCR反应条件:预变性94℃ 4 min,变性94℃ 30 s,退火58℃ 30 s,延伸68℃ 30 s(30 s/kb),30个循环。循环结束在25 μ L体系中加0.25 μ L Taq酶,72℃ 10 min,反应结束后,取3 μ L反应产物进行1%琼脂糖凝胶电泳,检测扩增情况。

1.3.3 目的片段的克隆 DNA纯化过程按照DNA回收试剂盒(AxyPrep DNA凝胶回收试剂盒)使用说明进行,

DNA 与 pMDT19-T 载体连接, 将连接产物转化 E.coli DH5 α 菌感受态细胞中。

1.3.4 大鼠 C-sis 基因表达载体的鉴定 挑取阳性克隆菌落进行摇菌扩增, 将鉴定出的阳性菌种用通用引物进行测序, 应用 DNAMAN 软件进行序列比对。提取重组质粒, 经限制性内切酶 *EcoR* I、*Xba* I 酶切初步鉴定。

1.3.5 将 pCDNA3.1/C-sis(或空载 pCDNA3.1) 转染进入大鼠正常肝细胞株 BRL 细胞 BRL 细胞的培养条件: 含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 37 °C、体积分数 5% CO₂、饱和湿度培养箱中培养。取正常培养的处于对数期的 BRL 细胞, 用 0.25% Trypsin+0.02% EDTA 消化, 1 500 r/min 离心 5 min, 计数板下计数, 铺 6 孔板, 每孔均加入 8×10^4 个细胞, 放入 37 °C、体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养。细胞完全贴壁后, 根据 lipo3000 转染试剂说明书, 加入相应比例的质粒和 lipo3000。孵育 6-8 h 后吸弃原培养基后, 更换为含浓度为 200 μ mol/L 的 H₂O₂ 培养基继续培养, 作用 48 h 后收获细胞。分组如下: 空白对照组(不做任何处理)、空载质粒组(转染空载质粒 pCDNA3.1)、C-sis 质粒组(转染重组质粒 pCDNA3.1/C-sis)。

1.3.6 将 pCDNA3.1/C-sis(或空载 pCDNA3.1) 导入进入大鼠肝脏 大鼠经乙醚麻醉后, 800 μ g 质粒溶于 15 mL 林格氏液中, 在 15 s 内快速从鼠尾静脉注入。48 h 后提取大鼠肝组织。分组如下: 空白对照组(仅注射林格氏液)、空载质粒组(注射空载质粒 pCDNA3.1)、C-sis 质粒组(注射重组质粒 pCDNA3.1/C-sis)。造模成功的检测标准: 利用荧光定量 PCR 和 Western Blot 检测 C-sis 质粒组的 C-sis 表达是否较空白对照组升高。

1.4 指标测定

1.4.1 Western Blot 用 RIPA 法取总蛋白, BCA 法测定蛋白质浓度, 取 100 μ g 进行 SDS-PAGE 电泳分离蛋白。蛋白转印到硝酸纤维素膜上, 脱脂奶粉溶液 4 °C 封闭过夜。膜分别用按相应比例稀释的 C-sis 和 GAPDH 的 I 抗孵育, 4 °C 过夜, II 抗孵育 2 h, DAB 显色照相。结果用 Quantity One 4.62 软件, 以目的条带/GAPDH 的灰度值进行分析。

1.4.2 荧光定量 PCR 细胞总 RNA 抽提和反转录参照试剂说明书进行操作。C-sis 上游引物为 5'-ATG ACC CGA GCA CAT TCT GG-3', 下游引物为 5'-ACA CCT CTG TAC GCG TCT TG-3'; β -actin 上游引物为 5'-CCC ATC TAT GAG GGT TAC GC-3', 下游引物为 5'-TTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC-3'。PCR 反应体系如下:

2 $\times$ SuperReal premix plus 10 μ L, 10 μ mol/L 上游引物 1 μ L, 10 μ mol/L 下游引物 1 μ L, cDNA(加水稀释成一致水平) 8 μ L。按下列条件进行扩增: 95 °C 15min, 95 °C 10 s, 60 °C 20 s, 72 °C 20 s 模板阅读, 39 个循环, 熔融曲线 70 °C to 95 °C: 增量 0.5 °C 10 s 模板阅读。实验结果通过荧光定量 PCR 分析软件(BIO-RAD CFX Manager)进行计算和分析。

1.5 主要观察指标 通过电泳检验大鼠 C-sis 基因扩增的 PCR 产物大小与预期值是否相符合; 通过酶切和电泳检验重组质粒 pCDNA3.1/C-sis 构建是否成功; 通过荧光定量 PCR 和 Western Blot 检测 C-sis 基因表达。

1.6 统计学分析 应用统计软件 SPSS 13.0 进行分析, 数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较则采用 LSD 检验。P < 0.05 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 造模方法的改进 首先克隆了大鼠 C-sis 基因, 并构建 pCDNA3.1/C-sis 真核表达载体, 通过酶切测序以证实 C-sis 基因克隆成功与否。然后将 pCDNA3.1/C-sis 转染进入大鼠肝脏细胞, 并通过 RT-PCR 和 Western Blot 检测 C-sis 基因在大鼠正常肝细胞株 BRL 细胞和在体大鼠肝脏细胞中的表达。

2.2 模型稳定性 结果显示, pCDNA3.1/C-sis 真核表达载体构建成功, 且将其转染入 BRL 细胞及导入在体大鼠肝脏, RT-PCR 和 Western Blot 均显示 C-sis 的表达增加。C-sis 能在肝脏稳定高表达, 这为后续研究 C-sis 对暴发性肝衰竭的治疗作用提供了稳定模型。

2.3 大鼠 C-sis 基因的 RT-PCR 扩增 大鼠 C-sis 基因通过特异性引物扩展的 PCR 产物只有一条亮带, 位于 726 bp 的位置。根据数据库 GenBank 所收录的 C-sis 的基因序列(NM_24628), 所得产物大小与预期值相符合, 见图 1。

2.4 真核表达载体 pCDNA3.1/C-sis 的鉴定 限制性内切酶 *EcoR* I、*Xba* I 酶切重组质粒 pCDNA3.1/C-sis, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 初步鉴定重组质粒 pCDNA3.1/C-sis 构建成功, 见图 2。经南京金斯瑞公司测序, 与 Pubmed 数据库中 GenBank 所给序列(No: NM24628)对比同源性达到 100%, 进一步证实重组质粒 pCDNA3.1/C-sis 构建成功。

2.5 真核表达载体 pCDNA3.1/C-sis 的结构图 如图 3 所示, dh-1015 即为 C-sis 基因, 其余所示为酶切的位点。

2.6 pCDNA3.1/C-sis 转染 BRL 细胞后 C-sis mRNA 的表达 与空白对照组和空载质粒组比较, C-sis 质粒组的

C-sis mRNA表达量有明显增加, 见图4。

2.7 pcDNA3.1/C-sis转染BRL细胞后C-sis蛋白的表达与空白对照组、空载质粒组比较, C-sis质粒组的C-sis蛋白表达量有明显增加, 见图5。

2.8 pcDNA3.1/C-sis导入大鼠肝脏后C-sis mRNA的表达 实验结果由荧光定量PCR分析软件BIO-RAD CFX Manager自动进行统计和计算。与空白对照组和空载质粒组比较, C-sis质粒组的C-sis mRNA表达量有明显增加, 见图6。

2.9 pcDNA3.1/C-sis导入大鼠肝脏后C-sis蛋白的表达与空白对照组、空载质粒组比较, C-sis质粒组的C-sis蛋白表达量有明显增加, 见图7。

3 讨论 Discussion

暴发性肝衰竭是指突然出现大量肝细胞坏死或肝功能显著异常, 并在首发症状出现后 8 周内发生肝性脑病的一种综合征^[2]。暴发性肝衰竭的病因多种多样, 根据病原可分为感染性、毒素性、代谢性、浸润性、自身免疫性、缺血性、放射损伤性及原因不明性^[3]。其临床特点是起病急、病情危重, 症状表现多样, 肝细胞广泛坏死, 目前缺乏有效治疗手段, 病死率高^[4]。

已知脏器正常功能的维持需要依靠组织细胞的生长和死亡维持于某种平衡状态。而这种细胞稳态或组织稳态的维持有赖于原癌基因和抑癌基因表达之间的平衡。在生理情况下, 原癌基因参与了细胞的正常分裂、增殖、成熟和分化过程, 特别是参与了组织稳态的维持过程^[5]。因此, 原癌基因对于细胞的正常生长、组织修复起到了不可或缺的作用。组织损伤和脏器衰竭的主要原因是细胞的过度死亡和/或生长受抑。原癌基因的应用有可能从根本上逆转器官功能的衰竭并达到组织修复的目的。原癌基因也被看成为对组织急性损伤具有立即反应的“即早基因”。实验发现这类基因表达的激酶所介导的途径可修复心肌的缺血性损伤^[6]。

原癌基因 C-sis 是血小板衍生生长因子 B 链的编码基因^[7-8]。C-sis 其基本功能是通过多种机制促使有丝分裂信号向胞内转导并促进细胞增殖^[9-10]。C-sis 编码的蛋白血小板衍生生长因子 B 是一种较强的促有丝分裂源和化学诱导剂, 可刺激间胚叶来源细胞的分裂、增殖, 对血管的再生及创伤愈合有良好的促进作用^[11-12]。在一些恶性肿瘤中血小板衍生生长因子 B 表达增高, 或者血小板衍生生长因子 B 与其发生发展相关^[13-15]。但有研究表明, 血小板衍生生长因子 B 亦能够促进组织损伤的修

复。血小板衍生生长因子 B 可能有助于治疗艾滋病毒感染吸毒成瘾患者出现的神经元缺损^[16-17]。血小板衍生生长因子 B 也可能有益于因缺血再灌注而受损的肾小管细胞的修复^[18]。血小板衍生生长因子 B 能有效募集骨髓间充质干细胞, 从而促进骨愈合^[19]; 并能募集间充质原始细胞, 进而可能有助于骨质疏松相关骨折的恢复^[20]。将用血小板衍生生长因子 B 修饰了的人造骨进行体内移植, 可发现血小板衍生生长因子 B 能诱导血小板衍生生长因子受体阳性的骨髓间充质干细胞或者前成骨细胞转移至人造骨, 这促进了人造骨与宿主的融合^[21]。以上提示 C-sis 具有促进细胞增殖并抑制凋亡, 进而促进组织修复的功能。因此, 可以假设 C-sis 可能在受损肝组织的修复和暴发性肝衰竭的治疗中发挥积极作用。因此, 为研究 C-sis 基因对大鼠暴发性肝衰竭的影响, 首先需构建大鼠 C-sis 基因的真核表达载体。

文章首先克隆了大鼠 C-sis 基因, 并构建 pcDNA3.1/C-sis 真核表达载体, 通过酶切测序以证实 C-sis 基因克隆成功与否。然后将 pcDNA3.1/C-sis 转染进入大鼠肝脏细胞, 并通过 RT-PCR 和 Western Blot 检测 C-sis 基因在大鼠正常肝细胞株 BRL 细胞和在体大鼠肝脏细胞中的表达。结果显示, pcDNA3.1/C-sis 真核表达载体构建成功, 且将其转染入 BRL 细胞和在体大鼠肝脏后 C-sis 的表达增加。

生物界的差别及不同的属性是由遗传密码所决定的, 遗传密码潜藏在 DNA 的 4 种碱基不同的排列组合内^[22-23]。对人类自身永恒不变的好奇心及对生老病死规律探寻, 尤其为了彻底祛除病痛的需要, 导致了基因研究已成为近 20 年以来最具魅力的学科之一。人类基因组的作图虽早在十多年前就已完成, 但是绝大多数的基因功能仍所知不多, 甚至可以说还仅为未解之谜。所以, 现今生命科学研究是基因功能研究的后基因组时代。基因的克隆是开展基因功能研究的必由之路^[24-25]。为研究 C-sis 基因对大鼠暴发性肝衰竭的影响, 作者进行了 C-sis 基因的克隆, 以便为下一步进行基因功能和基因治疗的研究提供物质基础。为开展基因克隆, 能够获得高纯度目的 cDNA 的片段非常关键^[26-27]。为此, 引物的克隆需要经过仔细的设计^[28-29]。所获得的 cDNA 电泳后位于 726 bp 的位置, 与基因库的预期值相符合。另外, 本实验中采用了 pcDNA3.1 质粒作为目的基因的亚克隆载体。质粒构建完成之后, 需进行酶切鉴定^[30-31]。而酶切鉴定一般需用到限制性内切酶^[32-33]。本研究使用了限制性内切酶 EcoR I、Xba I 酶切重组质粒 pcDNA3.1/

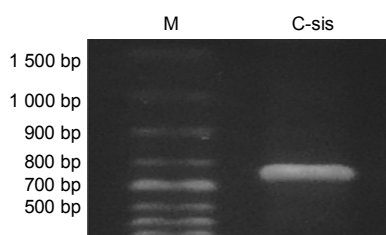


图1 大鼠 *C-sis* 基因 PCR 扩增
Figure 1 PCR amplification of *C-sis* gene in rats

图注: M: marker。PCR 产物位于 726 bp 的位置, 与基因库的预期值相符合。

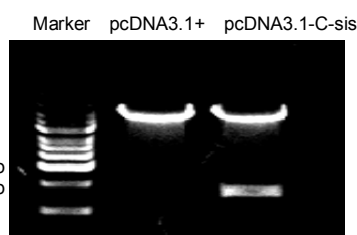


图2 真核表达载体 pcDNA3.1/*C-sis* 的酶切鉴定

Figure 2 The identification of pcDNA3.1/*C-sis* by enzyme digestion

图注: 将构建的真核表达载体酶切并电泳检测, 初步鉴定重组质粒 pcDNA3.1/*C-sis* 构建成功。

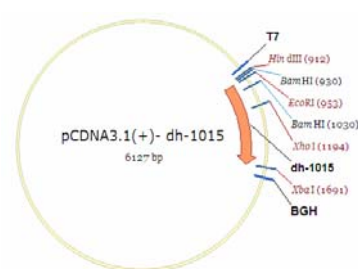


图3 真核表达载体 pcDNA3.1/*C-sis* 的结构图

Figure 3 The structure of the eukaryotic expression vector pcDNA3.1/*C-sis*

图注: dh-1015 即为 *C-sis* 基因, 其余所示为酶切的位点。

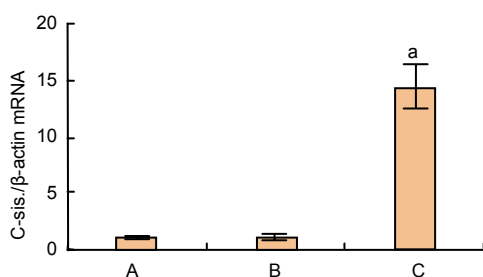


图4 荧光定量 PCR 检测 BRL 细胞中 *C-sis* mRNA 的表达变化
Figure 4 The expression changes of *C-sis* mRNA in BRL cell line detected by fluorescence quantitative PCR

图注: A 为空白对照组, B 为空载质粒组, C 为 *C-sis* 质粒转染组。n=5。与空白对照组和空载质粒组比较, $^aP < 0.01$ 。

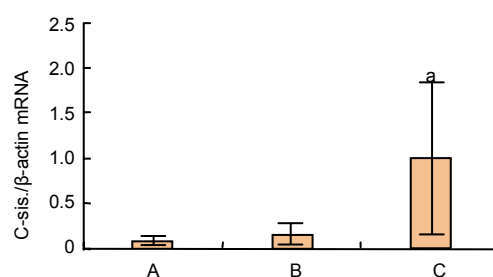


图6 荧光定量 PCR 检测大鼠肝脏 *C-sis* mRNA 的表达变化
Figure 6 The expression changes of *C-sis* mRNA in rat liver tissue detected by fluorescence quantitative PCR

图注: A 为空白对照组, B 为空载质粒组, C 为 *C-sis* 质粒转染组。与空白对照组和空载质粒组比较, $^aP < 0.01$ 。

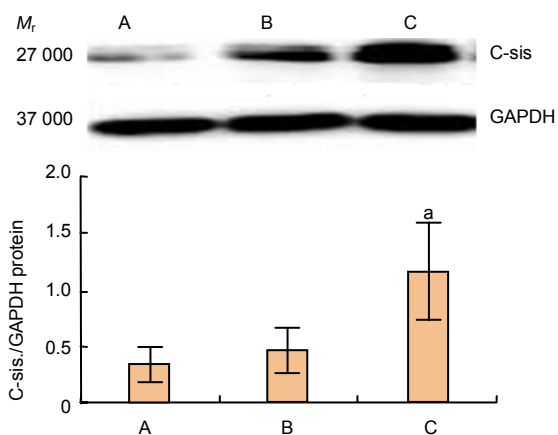


图5 Western Blotting 检测 BRL 细胞中 *C-sis* 蛋白的表达变化
Figure 5 The expression changes of *C-sis* protein in BRL detected by western blotting

图注: A 为空白对照组, B 为空载质粒组, C 为 *C-sis* 质粒转染组。n=5。与空白对照组和空载质粒组比较, $^aP < 0.01$ 。

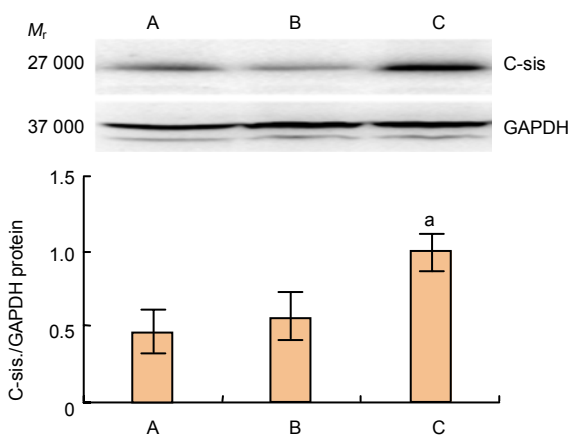


图7 Western Blotting 检测大鼠肝脏 *C-sis* 蛋白的表达变化
Figure 7 The expression changes of *C-sis* protein in rat liver tissue detected by western blotting

图注: A 为空白对照组, B 为空载质粒组, C 为 *C-sis* 质粒转染组。与空白对照组和空载质粒组比较, $^aP < 0.01$ 。

C-sis, 电泳所得条带大小与预期一致。鉴定证实后需要送序列测定^[34-35]。经对比无误即所测定的序列与基因库上公布序列一致后, 还要观察构建体能否在真核细胞中有效表达^[36-37]。作为机体主要的代谢及活性蛋白合成器官, 肝脏已经成为进行基因功能研究和基因治疗的重要靶器官。作者下一步工作也拟以肝脏作为

靶器官研究 *C-sis* 基因在动物整体内的生物学功能。

流体力学注射法是一种快速大容量裸质粒溶液体内注射方法。凭借该注射法, 目的基因可经鼠尾静脉导入动物活体器官, 且在靶器官中高表达。该法是 Liu 等^[38]人建立起来的, 表明裸质粒 DNA 经鼠尾静脉快速地大容量注射能导致目的基因在实验鼠体内高表达, 并且肝

脏是该目的基因表达的主要器官。Wang 等^[39]对硫代乙酰胺诱发的急性肝衰竭实验大鼠进行了基因治疗研究, 结果表明 *a-MSH* 基因经鼠尾静脉注射能显著降低急性肝衰竭大鼠死亡率, 明显改善肝脏组织学表现, 使得肝的 TUNEL 阳性细胞减少。在本实验中, 大鼠经乙醚麻醉后, 800 μ g 的 pcDNA3.1/C-sis 裸质粒溶于 15 mL 林格氏液中, 在 15 s 内快速从鼠尾静脉注入。48 h 后提取大鼠肝组织, 荧光定量 PCR 和 Western Blotting 显示 C-sis 质粒导入后的 C-sis 表达量有明显的增加。

本研究后续实验将从细胞水平用 H_2O_2 或诱导 BRL 细胞凋亡, 然后用上述重组质粒 pcDNA3.1/C-sis 转染细胞, 最终检测肝细胞的增殖和凋亡; 其次从动物水平, 用内毒素联合 D-半乳糖胺处理大鼠建立暴发性肝衰竭模型, 然后将 pcDNA3.1/C-sis 注入大鼠体内, 最终检测大鼠肝脏的增殖和凋亡。大鼠 C-sis 基因的克隆及其真核表达载体的成功构建为上述后续实验提供了先决条件和实验基础。

作者贡献: 所有作者均参与文章的设计、实施和评估。

利益冲突: 所有作者共同认可文章内容无相关利益冲突。

伦理问题: 实验方案经南昌大学第二附属医院医学伦理委员会批准。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经国内小同行外审专家双盲外审, 符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 第一作者孙国芳对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

4 参考文献 References

- [1] Hellström M, Kalén M, Lindahl P, et al. Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development*. 1999; 126(14):3047-3055.
- [2] Hoofnagke JH, Carithers RL, Shaprio C, et al. Fulminant hepatic failure: summary of a workshop. *Hepatology*. 1995;21(1): 240-252.
- [3] Zanet J, Pibre S, Jacquet C, et al. Endogenous Myc controls mammalian epidermal cell size, hyperproliferation, endoreplication and stem cell amplification. *J Cell Sci*. 2005;118(Pt 8): 1693-1704.
- [4] Landau E, Tirosh R, Pinson A, et al. Protection of thrombin receptor expression under hypoxia. *J Biol Chem*. 2000;275(4): 2281-2287.
- [5] Liu W, Kong H, Zeng X, et al. Iptakalim inhibits PDGF-BB-induced human airway smooth muscle cells proliferation and migration. *Exp Cell Res*. 2015;336(2): 204-210.
- [6] Virakul S, Dalm VA, Paridaens D, et al. Platelet-Derived Growth Factor-BB Enhances Adipogenesis in Orbital Fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015;56(9):5457-5464.
- [7] Saito Y, Hojo Y, Tanimoto T, et al. Protein kinase C-alpha and protein kinase C-epsilon are required for Grb2-associated binder-1 tyrosine phosphorylation in response to platelet-derived growth factor. *J Biol Chem*. 2002;277(26):23216-23222.
- [8] Lindqvist A, Nilsson BO, Ekblad E, et al. Platelet-derived growth factor receptors expressed in response to injury of differentiated vascular smooth muscle in vitro: effects on Ca^{2+} and growth signals. *Acta Physiol Scand*. 2001;173(2):175-184.
- [9] Li L, Xu M, Li X, et al. Platelet-derived growth factor-B (PDGF-B) induced by hypoxia promotes the survival of pulmonary arterial endothelial cells through the PI3K/Akt/Stat3 pathway. *Cell Physiol Biochem*. 2015; 35(2):441-451.
- [10] Sun L, Zhao R, Lan X, et al. Goniolactone C, a styryl lactone derivative, inhibits PDGF-BB-induced vascular smooth muscle cell migration and proliferation via PDGFR/ERK signaling. *Molecules*. 2014;19(12): 19501-19515.
- [11] Gressot LV, Doucette TA, Yang Y, et al. Signal transducer and activator of transcription 5b drives malignant progression in a PDGFB-dependent proneural glioma model by suppressing apoptosis. *Int J Cancer*. 2015;136(9):2047-2054.
- [12] Lynes J, Wibowo M, Koschmann C, et al. Lentiviral-induced high-grade gliomas in rats: the effects of PDGFB, HRAS-G12V, AKT, and IDH1-R132H. *Neurotherapeutics*. 2014;11(3):623-635.
- [13] Doucette TA, Kong LY, Yang Y, et al. Signal transducer and activator of transcription 3 promotes angiogenesis and drives malignant progression in glioma. *Neuro Oncol*. 2012;14(9):1136-1145.
- [14] Hu G, Yao H, Chaudhuri AD, et al. Exosome-mediated shuttling of microRNA-29 regulates HIV Tat and morphine-mediated neuronal dysfunction. *Cell Death Dis*. 2012;3:e381.

- [15] Yao H, Duan M, Yang L, et al. Platelet-derived growth factor-BB restores human immunodeficiency virus Tat-cocaine-mediated impairment of neurogenesis: role of TRPC1 channels. *J Neurosci.* 2012;32(29): 9835-9847.
- [16] Geng H, Lan R, Singha PK, et al. Lysophosphatidic acid increases proximal tubule cell secretion of profibrotic cytokines PDGF-B and CTGF through LPA2- and Gαq-mediated Rho and αvβ6 integrin-dependent activation of TGF-β. *Am J Pathol.* 2012;181(4):1236-1249.
- [17] Phipps MC, Xu Y, Bellis SL. Delivery of platelet-derived growth factor as a chemotactic factor for mesenchymal stem cells by bone-mimetic electrospun scaffolds. *PLoS One.* 2012;7(7):e40831.
- [18] Zhang Y, Cheng N, Miron R, et al. Delivery of PDGF-B and BMP-7 by mesoporous bioglass/silk fibrin scaffolds for the repair of osteoporotic defects. *Biomaterials.* 2012;33(28):6698-6708.
- [19] Yoshida S, Iwasaki R, Kawana H, et al. PDGFBB promotes PDGFRα-positive cell migration into artificial bone in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012; 421(4):785-789.
- [20] Fukuda K, Ogawa M, Taniguchi H, et al. Molecular Approaches to Studying Microbial Communities: Targeting the 16S Ribosomal RNA Gene. *J UOEH.* 2016;38(3):223-232.
- [21] Li B, Zhang Y, Li J, et al. Fine Mapping of Two Additive Effect Genes for Awn Development in Rice (*Oryza sativa* L.). *PLoS One.* 2016;11(8):e0160792.
- [22] Hackmann K, Kuhlee F, Betscheva-Krajcir E, et al. Ready to clone: CNV detection and breakpoint fine-mapping in breast and ovarian cancer susceptibility genes by high-resolution array CGH. *Breast Cancer Res Treat.* 2016;159(3):585-590.
- [23] Mukae H, Noguchi S, Naito K, et al. The Importance of Obligate Anaerobes and the *Streptococcus anginosus* Group in Pulmonary Abscess: A Clone Library Analysis Using Bronchoalveolar Lavage Fluid. *Respiration.* 2016; 92(2):80-89.
- [24] Tuo D, Shen W, Yan P, et al. Rapid Construction of Stable Infectious Full-Length cDNA Clone of Papaya Leaf Distortion Mosaic Virus Using In-Fusion Cloning. *Viruses.* 2015;7(12):6241-6250.
- [25] Zheng X, Tong W, Liu F, et al. Genetic instability of Japanese encephalitis virus cDNA clones propagated in *Escherichia coli*. *Virus Genes.* 2016;52(2):195-203.
- [26] O'Halloran DM. STITCHER: A web resource for high-throughput design of primers for overlapping PCR applications. *Biotechniques.* 2015;58(6):325-328.
- [27] Camilo CM, Lima GM, Maluf FV, et al. HTP-OligoDesigner: An Online Primer Design Tool for High-Throughput Gene Cloning and Site-Directed Mutagenesis. *J Comput Biol.* 2016;23(1):27-29.
- [28] Sun J, Wang L, Dong MM, et al. Construction and identification of multiple genes Co silence of plasmid shRNA. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(12):22053-22062.
- [29] Cheng A, Zhang Y, Mei H, et al. Construction of recombinant pEGFP-N1-hPer2 plasmid and its expression in osteosarcoma cells. *Oncol Lett.* 2016;11(4):2768-2772.
- [30] Shyma KP, Gupta SK, Gupta JP, et al. Restriction site detection in repetitive nuclear DNA sequences of *Trypanosoma evansi* for strain differentiation among different isolates. *J Parasit Dis.* 2016;40(3):1087-1090.
- [31] Zarrin M, Erfaninejad M. Molecular variation analysis of *Aspergillus flavus* using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of the internal transcribed spacer rDNA region. *Exp Ther Med.* 2016;12(3):1628-1632.
- [32] Thomsen MC, Ahrenfeldt J, Cisneros JL, et al. A Bacterial Analysis Platform: An Integrated System for Analysing Bacterial Whole Genome Sequencing Data for Clinical Diagnostics and Surveillance. *PLoS One.* 2016;11(6):e0157718.
- [33] Garrigue I, Moulinas R, Recordon-Pinson P, et al. Contribution of next generation sequencing to early detection of cytomegalovirus UL97 emerging mutants and viral subpopulations analysis in kidney transplant recipients. *J Clin Virol.* 2016;80:74-81.
- [34] Zhang R, Duan G, Shi Q, et al. Construction of a recombinant *Lactococcus lactis* strain expressing a fusion protein of Omp22 and HpaA from *Helicobacter pylori* for oral vaccine development. *Biotechnol Lett.* 2016;38(11):1911-1916.
- [35] Liu X, Fu G, Ji Z, et al. A Recombinant DNA Plasmid Encoding the sIL-4R-NAP Fusion Protein Suppress Airway Inflammation in an OVA-Induced Mouse Model of Asthma. *Inflammation.* 2016;39(4):1434-1440.
- [36] Gallagher EJ, LeRoith D, Stasinopoulos M, et al. Polyol accumulation in muscle and liver in a mouse model of type 2 diabetes. *J Diabetes Complications.* 2016; 30(6): 999-1007.
- [37] Cairns RA, Mak TW. Lung Cancer Resets the Liver's Metabolic Clock. *Cell Metab.* 2016;23(5):767-769.
- [38] Liu F, Song Y, Liu D. Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther.* 1999;6(7):1258-1266.
- [39] Wang CH, Jawan B, Lee TH, et al. Single injection of naked plasmid encoding alpha-melanocyte-stimulating hormone protects against thioacetamide-induced acute liver failure in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;322(1):153-161.