四川大学学报(医学版)
J Sichuan Univ (Med Sci Edi) 2018, 49(3):325 - 330

# 以慢病毒为载体的整合素 β8 RNAi 在新生鼠脑内干扰效率的研究*

唐彬秩[1]，屈　艺[2]，赵凤艳[2]，童　煜[2]，王德健[3△]

1. 四川省医学科学院·四川省人民医院/电子科技大学临床医学院 儿科（成都 610072）；
2. 出生缺陷与相关妇儿疾病教育部重点实验室(四川大学)（成都 610041）；
3. 成都中医药大学药学院 药理学教研室（成都 610075）

**【摘要】　目的**　制备稳定表达 pSicoR-β8 shRNA 的慢病毒载体系统，并评估其在新生鼠脑内 RNA 干扰(RNAi)效率。**方法**　将慢病毒表达载体 pSicoR-β8 shRNA、pSicoR-对照序列与慢病毒包装质粒系统 *pDM2G*、*g/p RRE* 和 *pRSV Rev* 分别进行扩增及质粒酶切鉴定，然后共转染 293T 包装细胞株，通过 293T 细胞的包装和分泌以收集携带目的干扰片段的慢病毒颗粒。利用 PEG-it 病毒浓缩试剂进行浓缩，50%组织培养感染剂量法(TCID50)测定病毒滴度。将浓缩后的慢病毒颗粒通过侧脑室注射对新生 SD 乳鼠中枢神经系统野生表达的整合素 β8 进行干扰，荧光显微镜下观察慢病毒侧脑室注射后脑组织中绿色荧光蛋白(GFP)的表达，结合 RT-PCR 和 Western blot 方法检测 β8 mRNA 和蛋白在干预后表达水平的变化，以评估 RNAi 效率及选择最佳干预时间。**结果**　质粒扩增及酶切结果显示各质粒片段大小分别与质粒图谱大小一致，浓缩后测得的病毒滴度为 LV-对照序列：$1.0\times10^8$ PFU/mL，LV-β8 shRNA：$5.0\times10^8$ PFU/mL。慢病毒侧脑室注射后 1 d，侧脑室周围即可观察到携带 GFP 的慢病毒整合到宿主细胞基因组并发出绿色荧光，注射后 2 d、3 d 和 5 d 可在脑组织切片中观察到较强的绿色荧光。β8 mRNA 表达水平在 RNAi 后 1～3 d 出现降低($P<0.05$)，第 3 天达到最大抑制作用，其 β8 mRNA 抑制率约为 56%。β8 蛋白表达变化趋势与 β8 mRNA 表达变化趋势基本一致，RNAi 后第 3 天达到最大抑制作用，其 β8 蛋白抑制率约为 51%。**结论**　成功获得滴度达到体内实验要求的含有 β8 shRNA 的慢病毒颗粒，并具有较好的体内干扰活性，为进一步研究整合素 β8 在新生鼠脑组织中的生理功能奠定了基础。

**【关键词】**　整合素 β8　慢病毒载体　RNAi　体内干扰

**Investigation of Lentiviral Vectors Based Integrin β8 RNAi System in Neonatal Rats' Brain**

*TANG Bin-zhi*[1], *QU Yi*[2], *ZHAO Feng-yan*[2], *TONG Yu*[2], *WANG De-jian*[3△]. 1. *Department of Pediatrics, Sichuan Academy of Medical Sciences & Sichuan Provincial People's Hospital/University of Electronic Science and Technology of China*, Chengdu 610072, China; 2. *Key Laboratory of Birth Defects and Related Disease of Women and Children (Sichuan University), Ministry of Education*, Chengdu 610041, China; 3. *Department of Pharmacology, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine*, Chengdu 610075, China

△ Corresponding author, E-mail: wdjwdj98@163.com

**【Abstract】　Objective**　To construct lentiviral vectors expressing pSicoR-β8 shRNA and evaluate its efficiency of RNA interference in neonatal rats' brain. **Methods**　Plasmid vectors pSicoR-β8 shRNA and pSicoR-control, as well as lentiviral packaging system *pDM2G*, *g/p RRE* and *pRSV Rev* were amplified respectively and plasmid DNA was identified by restriction enzyme digestion. Lentiviral packaging system and expressing vector pSicoR-β8 shRNA/pSicoR-control were co-transfected into packaging cell line 293T. Lentiviral particles expressing β8-shRNA or control sequence packaged and secreted by 293T were collected, concentrated by PEG-it, and viral titers were assayed by 50% tissue culture infective dose (TCID50). RNAi for integrin β8 in neonatal rats' brain was performed by intraventricular injection of lentivirus expressing β8-shRNA and rats received lentivirus expressing β8-shRNA were served as control. Green fluorescent protein (GFP) expression after intraventricular injection of GFP-Lentivirus was observed under fluorescence microscope, β8 mRNA and β8 protein expression were detected by RT-PCR and Western blot respectively, all of which were performed to evaluate the RNAi efficiency and to choose the

* 四川省人民医院博士基金资助项目(No. 30305030580)，四川大学出生缺陷与相关妇儿疾病教育部重点实验室开放课题资助项目(No. 2016001)，四川省科技厅基金(No. 2014SZ0149、No. 2016TD0002)和成都中医药大学科技发展基金资助项目(No. 030029052)资助

△ 通信作者，E-mail：wdjwdj98@163.com

optimal time for intervention. **Results** Restrictive endonuclease digestion and agarose gel electrophoresis showed plasmids as same as the expected size. Lentiviral titers for LV-control after concentration was $1.0\times10^8$ PFU/mL, and for LV-β8 shRNA $5.0\times10^8$ PFU/mL. One day after intraventricular injection of lentiviral vectors containing GFP sequence, lenticivirus genome was integrated into host cells and emitted green fluorescence. A relatively strong green fluorescence could be observed in brain slides 2 d, 3 d and 5 d after intraventricular injection. Western blot and RT-PCR demonstrated a maximum inhibition happened 3 d after intraventricular injection of LV-β8 shRNA, the inhibitory rate for β8 mRNA and β8 protein were 56% and 51%, respectively. **Conclusion** Lentiviral vectors expressing β8-shRNA are successfully constructed and lentiviral mediated β8-RNAi is successfully applied for *in vivo* use.

**【Key words】** Integrin β8 Lentiviral vectors RNAi *in vivo* interference

整合素是由 α 和 β 两个亚基组成的跨膜糖蛋白细胞表面受体,可通过与胞外配体和胞内细胞骨架成分、信号分子相互作用而发挥生物信号"整合"的功能。整合素 β8 亚基在哺乳动物脑组织内广泛分布并对脑血管形成和稳定、神经元黏附迁移增殖等生理功能具有重要意义[1]。

RNA 干扰(RNA interference,RNAi)技术近年来已被广泛用于阻断特定基因的表达,以评价该基因的功能作用。将 RNAi 成功导入靶细胞需要借助载体的帮助,目前常用的载体包括非病毒载体和病毒载体两大类。尽管非病毒载体对靶细胞的毒副作用较小,也不会激活免疫应答,但存在转染效率低、基因表达短暂等问题。目前 RNAi 更多地使用病毒作载体,其中在神经系统中应用最多的是慢病毒(lentivirus)RNAi 载体系统。慢病毒最大的优点是感染谱广,既可感染分裂细胞也可感染神经元等非分裂细胞。此外,慢病毒 DNA 可高效稳定地整合到宿主细胞基因组,使得 RNAi 效应持续存在,是神经系统基因功能研究和基因治疗的优良载体[2]。

本研究中,我们利用慢病毒包装质粒系统和表达载体 pSicoR-β8 shRNA/pSicoR-对照序列共转染 293T 包装细胞株,通过 293T 细胞的包装和分泌以收集携带目的干扰片段的慢病毒颗粒,经浓缩和滴度测定后通过侧脑室注射感染新生鼠脑组织以评估其体内干预效率。现报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

健康 SPF 级 10 日龄新生 SD 大鼠(P10)42 只,雌雄不限(四川大学实验动物中心提供),体质量 16～20 g。限制性内切酶 *Hin*d Ⅲ、*Eco*R Ⅴ 和 *Bam*H Ⅰ(TaKaRa);质粒中量提取试剂盒(Qiagen);感受态菌 DH5α,SYBR GREEN (Solarbio);1 kb plus DNA ladder(Invitrogen);高糖 DMEM 培养基(Hyclone);胎牛血清(FBS,GIBCO);FuGENE HD Transfection Reagent (Roche);PEG-it 病毒浓缩液(SBI);用于实验的慢病毒载体为含有 *GFP* 编码序列的 pSicoR 载体,购于 ATCC(American Type Culture Collection)。慢病毒包装质粒 *pDM2G*、*g/p RRE* 和 *pRSV Rev* 购自 Addgene 公司。

根据整合素 β8 基因小干扰 RNA(siRNA)靶序列所设计的短发夹 RNA(shRNA)模板序列如下(下划线部分为 β8 靶序列,斜体部分为其互补序列):F 5′-TGCATCAATGCACAATAATATTCAAGAGATAT*TATTGTGCATTGATGC*TTTTTTC-3′,R 5′-TCGAGAAAAAAGCATCAATGCACAATAATATCTCTTGAA*TATTATTGTGCATTGATGC*A-3′;同时设计对任意哺乳动物蛋白表达均无影响的对照序列如下(下划线部分为对照靶序列):F 5′-GATCCCCCGCCGAGCAGAAATAGAACTTCAAGAGAGTTCTATTTCTGCTCGGCGGGG-3′,R 5′-AGCTTTTCCAAAAACGCCGAGCAGAAATAGAACTCTCTTGAAGTTCTATTTCTGCTCGGCGGGGG-3′,含有已与 pSicoR 载体连接的上述 β8 及对照基因序列的重组质粒由出生缺陷与相关妇儿疾病教育部重点实验室(四川大学)保种。

小量 RNA 提取试剂盒(QIAGEN);cDNA Synthesis Kit (Bio Rad);2 × PCR Master Mix (Fermentas)。β-actin 引物由 Invitrogen 公司设计并合成,β8 引物由上海生工合成。β-actin 引物序列:F 5′-ACACTGTGCCCATCTAGGAGG-3′,R 5′-AGGGGCCGGACTCGTCATACT-3′;β8 引物序列:F 5′-CTGGGTATTTTCACTTGTTCT-3′,R 5′-CAGTATCACAACGTTCACTT-3′。

兔抗大鼠 β8 多抗(抗原序列 N′-EIKMDISKLNA-C′,由南京金斯瑞公司合成);小鼠抗大鼠 β-

actin 单抗（Sigma）；辣根过氧化物酶标记的抗兔 IgG 抗体，辣根过氧化物酶标记的抗鼠 IgG 抗体（北京中杉）；封闭用小牛血清白蛋白、PVDF 膜（Roche）；ECL 化学发光试剂盒（Millipore）；蛋白预染 Marker（Fermentas）。

### 1.2　质粒的扩增及鉴定

将慢病毒表达载体 pSicoR-对照序列、pSicoR-β8 shRNA 与慢病毒包装质粒系统 *pDM2G*、*g/p RRE* 和 *pRSV Rev* 质粒分别转化感受态菌 DH5α，扩增阳性克隆，质粒中量提取试剂盒提取质粒[3]。重组质粒鉴定：①限制性内切酶酶切鉴定：*Hin*d Ⅲ酶切 *pDM2G*，*Eco*R Ⅴ酶切 *g/p RRE*，*Bam*H Ⅰ酶切 *pRSV Rev*、pSicoR-对照序列及 pSicoR-β8 shRNA，10 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定片段的相对分子质量大小。②测序鉴定：将经电泳确定携带重组质粒的菌液送交宝生物公司（大连）有限公司进行基因测序。③BIO-RAD SmartSpec™ Plus 测定质粒质量浓度及纯度。

### 1.3　慢病毒载体的包装及收集、滴度测定

293T 细胞用含 15%FBS 的高糖 DMEM 培养基于 37 ℃、体积分数 5%$CO_2$ 饱和湿度条件下培养。用 FuGENE HD Transfection Reagent 将包装质粒 *pDM2G*、*g/p RRE*、*pRSV Rev* 与 pSicoR-对照序列或 pSicoR-β8 shRNA 共转染到 293T 细胞中，转染过程按试剂说明书进行；同时设立两个阴性对照：即仅加质粒对照（不含转染试剂）和仅加 Transfection Reagent 对照。48 h 后荧光显微镜下观察 293T 细胞 GFP 荧光表达情况。收集病毒颗粒（LV-β8 shRNA 和 LV-对照序列），PEG-it 病毒浓缩液进行浓缩后 50%组织培养感染剂量法（TCID50）测定病毒滴度。

### 1.4　侧脑室病毒注射

参照大鼠脑立体定位图谱，选取注射进针点和进针深度为：前囟向后 1 mm，矢状缝向右 1.5 mm，垂直进针 3 mm，抽取 5 μL 按 1.3 部分方法制备的病毒液或 0.01 mol/L PBS（对照组）缓慢注射入右侧侧脑室，缝合皮肤。注射后 1 d、2 d、3 d、5 d 和7 d 取脑组织，10 μm 冰冻切片后于荧光显微镜下观察脑组织中 GFP 的表达。

### 1.5　RT-PCR 检测 β8 mRNA 表达

取 LV-β8 shRNA 侧脑室注射后 1 d、2 d、3 d、5 d和 7 d 的脑组织，以 LV-对照序列注射后 3 d 的脑组织作为对照组，距离侧脑室注射部位前、后各 3 mm，冠状切取右侧半球皮层和海马脑组织。提取脑组织总 RNA，通过电泳鉴定 RNA 纯度及完整性，应用 cDNA Synthesis Kit 将 RNA 逆转录为 cDNA，PCR 扩增目的基因 cDNA 片段（94 ℃预变性 4 min；94 ℃变性 45 s，55 ℃复性 45 s，72 ℃延伸 45 s，共 38 个循环；72 ℃保温 10 min），反应产物行 20 g/L琼脂糖凝胶电泳。测定 β8 和 β-actin mRNA 条带的积分密度值（integrated density value，IDV），计算 β8/β-actin 的 IDV 比值，即为 β8 mRNA 相对表达量。

### 1.6　Western blot 检测 β8 蛋白表达

标本收集同 1.5 部分。预冷 RIPA 裂解液提取脑组织总蛋白，BCA 法测定蛋白浓度后以 100 μg/孔上样。80 g/L SDS-PAGE 电泳，湿法转膜至 PVDF 膜，封闭，一抗室温孵育 1 h（抗体稀释浓度分别为 β8 多抗 1∶1 000，β-actin 单抗 1∶2 000），4 ℃过夜，二抗室温孵育 1 h（稀释浓度 1∶3 000），TBST 洗膜后 ECL 化学发光试剂盒曝光显影，测定并计算 β8/β-actin 的 IDV 比值，即为 β8 蛋白相对表达量。

### 1.7　统计学方法

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。组间比较行单因素方差分析，两两比较采用 LSD 法，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2　结果

### 2.1　质粒鉴定结果

用 *Hin*d Ⅲ对质粒 *pMD2G* 进行酶切，电泳结果显示有约 6.0 kb 的对应条带出现。用 *Eco*R Ⅴ对质粒 *g/p RRE* 进行酶切，可见约 8.9 kb 的对应条带出现。用 *Bam*H Ⅰ对质粒 *pRSV Rev* 进行酶切，可见约 4.2 kb 的条带出现。用 *Bam*H Ⅰ对重组质粒 pSicoR-对照序列、pSicoR-β8 shRNA 进行单酶切，可见约 7.6 kb 条带出现，分别与质粒图谱大小一致（图 1）。DNA 测序进一步证实序列。经紫外分光光度计测定，质粒质量浓度范围为 1.24～1.66 mg/mL，纯度范围为 1.59～1.85（$A_{260}/A_{280}$）。

### 2.2　病毒包装、收集及病毒滴度测定结果

转染 48 h 后，荧光显微镜下观察 293T 细胞 GFP 荧光表达情况。β8 或对照质粒转染组均有 GFP 表达，而两个阴性对照组无 GFP 表达（图 2）。浓缩后测得的病毒滴度为 LV-对照质粒：$1.0\times10^8$ PFU/mL，LV-β8 shRNA：$5.0\times10^8$ PFU/mL。

### 2.3　慢病毒侧脑室注射后脑组织的感染情况

荧光显微镜下可见，注射后1 d右侧脑室周围

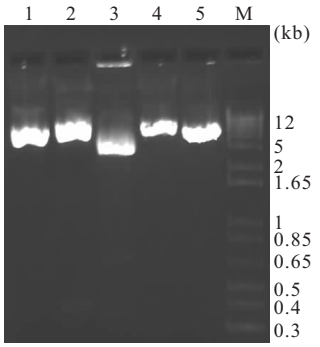



**图 1 包装质粒 *pMD2G*、*g/p RRE*、*pRSV Rev* 和载体质粒 pSicoR-对照序列、pSicoR-*β*8 shRNA 酶切鉴定图**

**Fig 1 Restrictive endonuclease analysis of package system *pMD2G*, *g/p RRE*, *pRSV Rev* and vector system pSicoR-control, pSicoR-*β*8 shRNA**

1: *pMD2G* digested by *Hind* Ⅲ; 2: *g/p RRE* digested by *Eco*R Ⅴ; 3: *pRSV Rev* digested by *Bam*H Ⅰ; 4: pSicoR-control digested by *Bam*H Ⅰ; 5: pSicoR-*β*8 shRNA digested by *Bam*H Ⅰ; M: DNA ladder

即可观察到携带 GFP 的慢病毒整合到宿主细胞基因组并发出绿色荧光,注射后 2 d、3 d 和 5 d 可在脑组织切片中观察到较强的绿色荧光,但在注射后 7 d 绿色荧光的强度有所减弱(图 3)。

### 2.4 RNAi 后 *β*8 mRNA 表达情况

结果见附表。对提取的脑组织总 RNA 行 10 g/L琼脂糖凝胶电泳,可见 28S、18S、5S 3 条亮度依次递减的清晰条带,所提取的总 RNA 无明显降解,RNA 质量浓度及纯度检测表明质量浓度在 1～1.5 μg/μL之间,$A_{260}/A_{280}$ 比值在 1.6～1.9 之间,说明提取的 RNA 样品纯度较高,满足后续实验要求(图 4A)。RT-PCR 显示,1 d、2 d、3 d、5 d、7 d 组以及对照组均可见 167 bp 的扩增产物 *β*8 和 621 bp 的扩增产物 β-actin(图 4B)。接受 LV-*β*8 shRNA 侧脑室注射的右侧脑组织,*β*8 mRNA 表达水平在 RNAi 后1～3 d出现降低($P<0.05$),5 d后恢复到对照组水平($P>0.05$)。其中注射后3 d达到最大抑制作用,*β*8 mRNA 抑制率约为 56%(附表)。

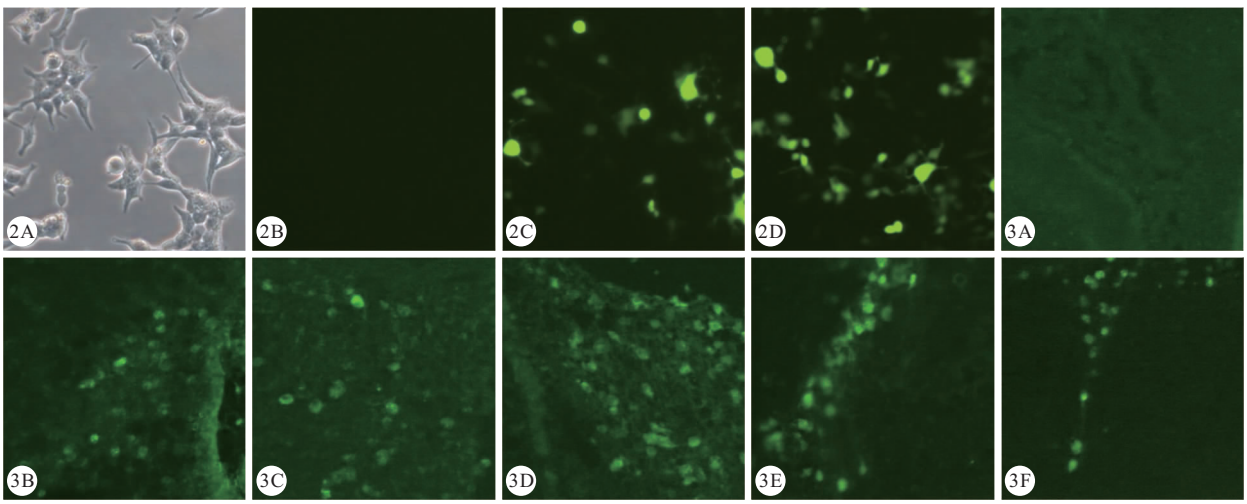



**图 2 质粒转染 293T 细胞图。×200**

**Fig 2 Transfection of plasmids into 293T cells. ×200**

**图 3 慢病毒侧脑室注射后不同时间点脑室周围脑组织 GFP 表达情况。×100**

**Fig 3 GFP expression at different time points after intraventricular injection of GFP-Lentivirus. ×100**

2A: 293T cells in DMEM medium; 2B: 293T cells in negative control; 2C: 293T cells transfected with pSicoR-control; 2D: 293T cells transfected with pSicoR-*β*8 shRNA; 3A: 3 d after PBS injection into right lateral ventricle; 3B-3F: 1 d, 2 d, 3 d, 5 d and 7 d after intraventricular injection of GFP-Lentivirus, respectively

### 2.5 RNAi 后 β8 蛋白表达情况

结果见附表。Western blot 检测结果显示,5 d、7 d 组以及对照组在相对分子质量约为 $95\times10^3$ 处有条带(β8蛋白)显影(图 5)。接受 LV-*β*8

**附表 RNAi 后不同时间点 *β*8 mRNA 和 β8 蛋白相对表达量(IDV,$\bar{x}\pm s$)**

**Table Expressions of *β*8 mRNA and β8 protein at different time points after RNAi treatment (IDV,$\bar{x}\pm s$)**

| Group | *n* | Control | 1 d | 2 d | 3 d | 5 d | 7 d |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *β*8 mRNA | 3 | 0.268±0.047 | 0.143±0.019* | 0.153±0.030* | 0.118±0.019* | 0.215±0.042 | 0.237±0.030 |
| β8 protein | 3 | 0.270±0.066 | 0.147±0.031* | 0.166±0.034* | 0.134±0.040* | 0.209±0.047 | 0.235±0.048 |

* $P<0.05$, vs. control group (3 d after intracerebral injection of LV-control)

shRNA 侧脑室注射的右侧脑组织，β8 蛋白表达水平在 RNAi 后 1～3 d 出现降低（$P<0.05$），5 d 后恢复到对照组水平（$P>0.05$）。LV-β8 shRNA 侧脑室注射后 3 d 达到最大抑制作用，其 β8 蛋白抑制率约为 51%。

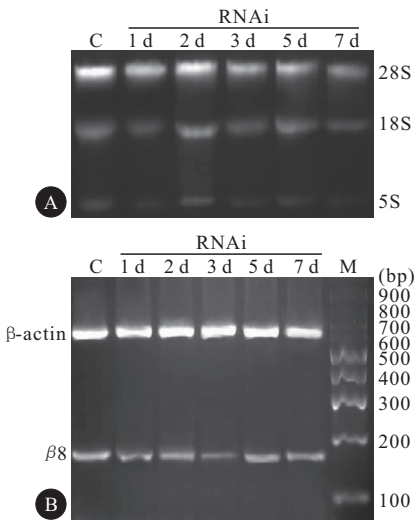



**图 4　RT-PCR 半定量检测 RNAi 后 β8 mRNA 表达变化**

**Fig 4　Semiquantitative RT-PCR analysis of β8 mRNA expression after RNAi treatment**

C: Control group (3 d after intracerebral injection of LV-control); M: DNA ladder; A: Total RNA extracted from rat brain; B: β8 mRNA expression detected by RT-PCR

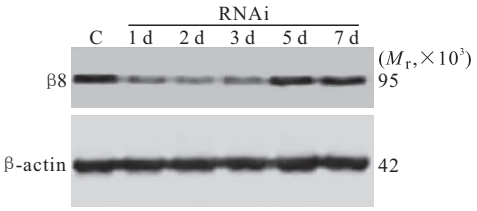



**图 5　Western blot 检测 RNAi 后 β8 蛋白表达变化**

**Fig 5　Western blot analysis of β8 protein expression after RNAi treatment**

C: Denotes the same as that in fig 4

## 3　讨论

shRNA 由 2 个反方向短重复序列构成，RNAi 通过 shRNA 的介导，诱导核酸酶降解与该 RNA 同源的 mRNA，从而干扰特定基因的表达。尽管近年来 CRISPR/Cas9 等新技术大有替代包括 RNAi 在内的传统基因干预技术的趋势，但由于其技术稳定成熟，RNAi 仍是目前人们研究基因功能、开展基因治疗的重要工具之一[4]。如何高效地将 shRNA 导入细胞是决定 RNAi 效率的关键之一，理想的 RNAi 载体需同时提供高效的基因转染效率、长期稳定的 RNAi 作用以及生物安全性[5]。

以慢病毒作为 RNAi 载体具有以下优势：①慢病毒较少引起宿主抗病毒因子的活化及免疫反应，脱靶效应低，生物安全性好[6]。②较之非病毒载体，慢病毒载体容纳转基因片段大、转染效率高、表达时间长；较之腺病毒等非整合病毒载体，慢病毒载体构建的 shRNA 可高效地整合至靶细胞基因组中且能稳定持久表达[7]。③慢病毒宿主范围广，可感染分裂期及静止期细胞，对传统转染试剂难以转染的神经元等非分裂期细胞具有良好的转染效率[8]，并可容纳大片段外源性目的基因[9]。因此，以慢病毒为载体的 RNAi 系统近年来在神经系统基因功能研究和基因治疗中得到了广泛的应用。

本实验所采用的慢载体系统由包装成分和载体成分两部分组成。包装成分包括：编码衣壳蛋白的 *pDM2G* 基因（*pDM2G*），编码结构蛋白和病毒复制所需酶的 *Gag/Pol* 基因（*g/p RRE*），调节病毒基因转录和促进病毒胞内转运的 *Rev* 基因（*pRSV Rev*）[10]。这些病毒包装所必需的元件被分开构建到 3 个质粒上，其目的是降低慢病毒载体利用宿主细胞产生新的病毒颗粒的风险。含有 *GFP* 编码序列的载体成分 pSicoR 能在宿主细胞中持续表达 shRNA 的同时表达 GFP，以利于在荧光显微镜下直接观察体外病毒包装时的转染效率及体内中枢神经系统感染效率。本实验中，将包装成分的 3 个质粒（*pDM2G*，*pRSV Rev*，*g/p RRE*）与载体成分（pSicoR-β8 shRNA/pSicoR-对照序列）共转染 293T 细胞后 GFP 阳性细胞率达到 80%以上，提示成功获得携带目的基因片段的慢病毒颗粒（LV-β8 shRNA 或 LV-对照序列）。

由于进行体内转染（侧脑室注射病毒进行脑组织转染）要求病毒注射液的体积控制在一定的范围（≤5 μL），因此我们对收集到的含有病毒颗粒的培养基上清进行了进一步的浓缩处理。TCID50 是一种将病毒液进行倍比稀释，通过观察不同稀释度病毒感染 293T 细胞的能力来估计病毒感染力的滴度测定法，它操作简单，较传统空斑法速度更快，结果的稳定性更好，且不需要专门的试剂仪器，已被广泛用于多种病毒滴度的测定[11]。本实验中，TCID50 滴度测定结果显示慢病毒颗粒经浓缩后，其滴度和感染力满足体内实验的需要。

目前有关整合素 β8 功能的研究多采用条件基因敲除技术[12]或制备 $\beta8^{-/-}$ 表型动物[13]。尽管通

过上述技术手段获得的转基因动物具有抑制效率高、表型稳定等优点,但其相对较高的技术成本和较高的死亡率在一定程度上限制了其应用。本研究所采用的 RNAi 其抑制率可达 50%以上,且技术要求相对较低,实验动物耐受性好。

本研究中,慢病毒注射后 1 d 侧脑室周围即可观察到绿色荧光,注射后 2 d、3 d 和 5 d 可在脑组织切片中观察到较强的绿色荧光,但在注射后 7 d 绿色荧光的信号强度有所减弱。结合 RT-PCR 检测 β8 mRNA 表达和 Western blot 检测 β8 蛋白表达的结果,我们发现,本研究中所使用的慢病毒 RNAi 系统在侧脑室注射给药后 1～3 d 具有较明显的抑制作用,RNAi 后第 3 天左右可达最大抑制效率,而干预 5 d 后其抑制效果出现反弹,这与之前报道的慢病毒介导的 RNAi 效应可维持较长的时间有差异[14-15]。考虑原因如下:整合素 β8 主要由脑内神经胶质细胞所表达,之前所报道的基于慢病毒载体的 RNAi 体内应用多是在成年鼠体内进行,而本次研究对象为新生大鼠,其脑组织处于非常活跃的增殖状态,自身增殖使得神经胶质细胞数目随着时间的延长不断增加,导致慢病毒感染的细胞在整个脑组织细胞中所占的比例不断降低,因而 β8 表达在 5 d后有所回升,RNAi 效率出现下降。

综上所述,本研究在体外成功制得满足体内实验要求的含 β8 shRNA 的慢病毒颗粒,选择在后续实验开始前的 2～3 d 进行 RNAi,能保证后续实验开展时 β8 处于表达被有效抑制的状态。

## 参 考 文 献


[1] LIU J, ZENG L, KENNEDY RM, *et al*. βPix plays a dual role in cerebral vascular stability and angiogenesis, and interacts with integrin αvβ8. Dev Biol,2012,363(1):95-105.

[2] SIZEMORE RJ, SEEGER-ARMBRUSTER S, HUGHES SM, *et al*. Viral vector-based tools advance knowledge of basal ganglia anatomy and physiology. J Neurophysiol,2016,115(4):2124-2146.

[3] 唐彬秩, 赵凤艳, 韦 婷, 等. dn HIF-1α 对宫颈癌细胞生物学行为的影响. 四川大学学报(医学版),2008,39(3):383-387.

[4] CHERY J. RNA therapeutics: RNAi and antisense mechanisms and clinical applications. Postdoc J,2016,4(7):35-50.

[5] 唐彬秩, 秦豪杰, 傅 强, 等. 重组腺相关病毒:很有潜力的基因治疗载体. 生物化学与生物物理进展,2006,33(8):711-718.

[6] DANG Y, LOEWEN R, PARIKH HA, *et al*. Gene transfer to the outflow tract. Exp Eye Res,2017,158:73-84[2017-05-15]. https://doi.org/10.1016/j.exer.2016.04.023.

[7] 李诗鹏, 李 强, 石正松, 等. 基因重组腺病毒载体与慢病毒载体转染兔骨髓间充质干细胞的对比. 中国组织工程研究,2017,21(9):1340-1345.

[8] CHEN MH, LIU YH, XU H, *et al*. Lentiviral vector-mediated p27kip1 expression facilitates recovery after spinal cord injury. Mol Neurobiol,2016,53(9):6043-6056.

[9] COUNSELL JR, ASGARIAN Z, MENG J, *et al*. Lentiviral vectors can be used for full-length dystrophin gene therapy. Sci Rep,2017,7(1):79.

[10] 窦立萍, 达万明, 王 畅, 等. Kir2ds4 基因 RNAi 慢病毒载体的构建与鉴定. 中国实验血液学杂志,2008,16(3):663-666.

[11] 杨海玉, 马智龙. 应用 TCID50 法比较 4 种细胞对呼吸道腺病毒的敏感性. 现代预防医学,2014,41(23):4345-4346.

[12] MA L, SHEN F, JUN K, *et al*. Integrin β8 deletion enhances vascular dysplasia and hemorrhage in the brain of adult Alk1 heterozygous mice. Transl Stroke Res,2016,7(6):488-496.

[13] ARNOLD TD, NIAUDET C, PANG MF, *et al*. Excessive vascular sprouting underlies cerebral hemorrhage in mice lacking αVβ8-TGFβ signaling in the brain. Development,2014,141(23):4489-4499.

[14] ZHENG YQ, LIU JX, LI XZ, *et al*. RNA interference-mediated downregulation of Beclin1 attenuates cerebral ischemic injury in rats. Acta Pharmacologica Sinica,2009,30(7):919-927.

[15] ZHU Z, ZENG XH, TURECEK J, *et al*. RNA interference of GluN1 inhibits neuronal rhythmogenesis in the adult inferior olive. J Mol Neurosci,2015,55(2):416-429.


(2017－09－22 收稿,2017－12－20 修回)

编辑 余 琳