论著

文章编号:1000-5404(2010)05-0422-05

慢病毒介导的 CYP3A11 基因 knock-down 小鼠的建立

庞 浩,刘昌峨,刘 勤,王露露,郭科男,王 勇,魏 泓 (400038 重庆,第三军医大学基础医学部实验动物学教研室)

[摘要] **目的** 构建和筛选小鼠 P450 3A11 基因 miR RNAi 慢病毒载体,建立 CYP3A11 基因 knock-down 小鼠。**方法** 利用 Ravi Sachidanandam's Lab 的在线软件设计沉默小鼠 P450 3A11 基因的 miRNA 所对应的 shRNA 序列,PCR 扩增后克隆到 PCI-GFP-MiR 质粒中,其再与慢病毒载体 FUW 进行重组。将 psPAX2 和 pMD2. G 两个载体和 FUW-GFP-MiR-shRNA 重组慢病毒载体共转染 293FT 细胞,包装成病毒。用包装好的病毒液感染 293FT 细胞后,并利用 GFP 蛋白表达水平进行滴度测定。将上述重组慢病毒载体分别转染 FVB/N 小鼠肝细胞,转染 48 h 后,检测 P450 3A11 基因 mRNA 表达水平的变化。选取干扰效果最好的 FUW-GFP-MiR-shRNA1 重组慢病毒载体进行制备基因 knock-down 小鼠模型。用显微注射法将浓缩的 shRNA1 病毒液注射至 FVB/N 小鼠 12 细胞期胚胎透明带下。将注射后发育至 22 细胞期的胚胎移植至假孕受体母鼠,得 F0 代小鼠。在紫外光照射下利用滤光片观察 GFP 在小鼠活体内的表达水平。**结果** DNA 测序结果显示 3 个重组慢病毒载体均与所设计的 shRNA 序列一致。检测的 3 个浓缩前慢病毒悬液的滴度均≥10^6 TU/ml,经过高速离心对病毒进行浓缩和纯化,其滴度达到 10^9 TU/ml 以上。转染 FUW-GFP-MiR-shRNA1、2 的 2 组肝细胞的 P450 3A11 基因 mRNA 表达水平相对于空白对照组均显著下降($P < 0.05$),而转染阴性对照 FUW-GFP-MiR-shRNA-NC 的肝细胞 P450 3A11 基因 mRNA 表达水平相对于空白对照组无明显改变。选用 FUW-GFP-MiR-shRNA1 慢病毒载体制备的 F0 代 3A11 基因 knock-down 小鼠,在紫外光照射下,阳性小鼠可见较强的荧光。**结论** 构建并筛选出小鼠 P450 3A11 基因有效的靶向 miR RNAi 慢病毒载体,并成功建立 CYP3A11 基因 knock-down 小鼠。

[关键词] 细胞色素 P-450 CYP3A;knock-down;微 RNAs;慢病毒;小鼠
[中图法分类号] R-332; R373; R394-33 [文献标志码] A

Establishment of CYP3A11 gene knock-down mouse by lentiviral transgenesis

Pang Hao, Liu Chang'e, Liu Qin, Wang Lulu, Guo Kenan, Wang Yong, Wei Hong (Department of Laboratory Animal Science, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To construct miR RNAi lentiviral vectors of mouse cytochrome P450 3A11 and establish CYP3A11 gene knock-down mouse model. **Methods** The corresponding shRNA sequences of miRNA for silencing the mouse P450 3A11 gene were designed by on-line designer software on Ravi Sachidanandam's Lab Website and synthesized by PCR. The PCR products were cloned into the PCI-GFP-MiR vector. Then the PCI-GFP-MiR-shRNA vector was recombined with the FUW lentiviral vector. The obtained lentiviral vectors containing P450 3A11 shRNA were confirmed by double enzyme digestion and sequencing. Each FUW-GFP-MiR-shRNA lentiviral vector was packaged with other vectors, psPAX2 and pMD2. G, in 293FT cells. Culture supernatant was harvested and concentrated by high speed centrifugation. The titre of the pseudotype virus were tested by detecting GFP expression level after transfecting into 293FT cells with the solution containing the virus particles. Three recombinant vectors were transfected into the hepatic cells of FVB/N mouse. After transfection for 48 h, the expression of P450 3A11 in the hepatic cells was detected. The concentrated shRNA1 virus solution was injected into perivitelline space of mouse 12-cell eggs. The injected 22-cell egg was transferred into the oviduct of pseudo-pregnant female mice, which gave birth to F0 offspring. GFP expression was observed with a filter in mouse body under UV light. **Results** The DNA sequencing results showed that the sequence of 3 recombinant lentiviral vectors were all the same as the sequence of corresponding shRNA. The titre of the primary virus solution were all ≥10^6 TU/ml, and that after concentration were all ≥10^9 TU/ml. Compared with the blank control groups, transfection of 2 targeting FUW-GFP-MiR-shRNA lentiviral vectors in the hepatic cells

[基金项目] 国家自然科学基金(30700076)
[通信作者] 王 勇,电话:(023)68753882,E-mail:yongw7528@gmail.com
魏 泓,电话:(023)68752330,E-mail:weihong63528@163.com

knocked down the expression of P450 3A11mRNA significantly. However, there was no obvious difference between the expression of negative control FUW-GFP-MiR-shRNA-NC groups and the blank control groups. The F0 offspring of 3A11 gene knock-down mouse introduced by FUW-GFP-MiR-shRNA1 lentiviral vectors showed visible GFP expression under UV light. **Conclusion** The effective miR RNAi lentiviral vectors of murine P450 3A11 gene are constructed and selected. CYP3A11 gene knock-down mouse is established successfully.

[Key words] cytochrome P-450 CYP3A; knock-down; microRNAs; lentiviral vector; mice

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30700076). Corresponding author: Wang Yong, Tel: 86-23-68753882, E-mail: yongw7528@gmail.com; Wei Hong, Tel: 86-23-68752330, E-mail: weihong63528@163.com

细胞色素P450(cytochrome,CYP450)是药物代谢中一类重要的代谢酶,约60%普通处方药需要通过P450酶进行生物转化[1]。而在P450中最重要的就是CYP3A亚家族,它们是哺乳动物体内药物生物转化的主要酶系,参与内源性物质的生物合成、代谢以及外源性物质的氧化代谢[2]。一直以来,P450酶的基因调控研究的难题是在体外没有一个有代表性的动物代谢模型模拟人P450酶的各个水平的变化。若能建立一个抑制自身P450基因的表达、导入人P450基因并正常表达的动物模型,则其药物代谢过程将和人类非常相似,将成为药物的安全与有效性评价极佳的研究模型。在小鼠体内,参与药物代谢的CYP3A亚系包括CYP3A11、CYP3A13、CYP3A16、CYP3A25、CYP3A41、CYP3A44、CYP3A57、CYP3A59等[3]。CYP3A11是最重要也是含量最丰富的亚型之一,占肝脏中CYPs总含量的20%以上[4-6]。利用miRNA而进行的RNA干扰(RNA interference,RNAi)可高效、特异地沉默小鼠自身的CYP3A11基因的表达。miRNA(microRNA,或称微小RNA)是一类20~23个核苷酸的非编码小RNA,是单链发夹结构RNA前体(shRNA)经过Dicer酶加工后生成的,通过与靶mRNA的互补配对而在转录后水平上对基因的表达进行负调控,导致mRNA的降解或翻译抑制[7]。本研究选择慢病毒表达系统,通过构建和筛选抑制P450 3A11表达的miR RNAi的慢病毒载体,建立P450基因knock-down小鼠,为后续研究以及人源化P450小鼠的建立打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 质粒小/大量提取试剂盒、DNA回收试剂盒(美国Omega公司),细胞培养基RPMI1640(美国HyClone公司),氨苄青霉素(北京鼎国生物),胎牛血清(FCS,银香伟业公司),胰蛋白酶(美国HyClone公司),磷酸钙转染试剂为2 mol/L $CaCl_2$,0.22 μm滤器过滤后4 ℃贮存备用,2×HBS(8.0 g NaCl、0.37 g KCl、201 mg $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$、1.0 g葡萄糖、5.0 g HEPES溶于500 ml水中,调pH值到7.05,过滤后4 ℃贮存备用)。293FT细胞、PCI-GFP-MiR载体质粒、慢病毒3质粒系统包括逆转录病毒载体FUW、psPAX2和pMD2.G为本实验室保存。大肠杆菌株DH5α购自北京天根生物技术公司。限制性核酸内切酶*Asc* Ⅰ和*Bam*HⅠ为NEB(BioLab)公司产品;*Xba* Ⅰ、*Xho* Ⅰ、*Eco*R Ⅰ、T_4 DNA连接酶、Ex*Taq*酶,DNA Fragment Purification Kit试剂盒、CellAmp™ Whole Transcriptome Amplification Kit试剂盒均为TaKaRa公司产品。M-2小鼠胚胎培养基(Embryo Max M-2,美国Chemicon公司),改进型M-16小鼠胚胎培养基(Embryo Max M-16 Modified,美国Chemicon公司),透明质酸酶(美国Sigma公司),以300 μg/ml溶解于M-2培养液中,凹玻片(上海机械进出口公司),硅化液Sigmacote(美国Sigma公司),G-100型毛细玻璃管(日本Narishige公司)。小鼠促排卵激素PMSG和HCG(宁波激素厂,工作浓度50 IU/ml)。

1.1.2 实验动物 FVB/N小鼠(供体)由第三军医大学实验动物中心提供[合格证号:SCXK(渝)2002007]。

1.2 方法

1.2.1 P450 3A11靶向特异性miRNA的设计 根据小鼠CYP3A11基因序列(NM_007818),通过Ravi Sachidanandam's Lab Website的在线程序筛选miRNA并设计所对应的shRNA,采用BLAST对选择的靶序列进行同源分析,排除非特异性的miRNA。根据PCI-GFP-MiR载体的要求,我们设计2条97 bp的shRNA长链序列并同时设计1条不针对小鼠任何基因的miRNA所对应的shRNA-NC序列(表1)。设计1对shRNA扩增引物:上游5′-GATGGCTGCTCGAGAAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCG-3′;下游5′-GTCTAGAGGAATTCCGAGGCAGTAGGCA-3′。小鼠CYP3A11基因和内参基因18S rRNA的mRNA检测引物以及上述核苷酸序列均由上海英骏(Invitrogen)生物科技有限公司合成。

表1 P450 3A11shRNA特异干扰序列

名称	序列(5′→3′)
shRNA1	TGCTGTTGACAGTGAGCGCTTAGGCACTGTGCTGAATTATTAGTGAAGCCACAGATGTAATAATTCAGCACAGTGCCTAAATGCCTACTGCCTCGGA
shRNA2	TGCTGTTGACAGTGAGCGAATTAAGAATGTGCTAGTGAAGTAGTGAAGCCACAGATGTACTTCACTAGCACATTCTTAATCTGCCTACTGCCTCGGA
shRNA-NC	TGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTTCTG CTGGAGTTCGTGAC

1.2.2 FUW-GFP-miR-shRNA重组质粒的构建 以合成的97 bp的shRNA长链为模板,加入shRNA扩增引物上、下游引物和Ex*Taq* DNA聚合酶进行PCR反应,反应体系为50 μl,反

应条件:94 ℃,5 min; 94 ℃,30 s,54 ℃,30 s,75 ℃,30 s,循环12次;最后75 ℃延伸2 min。PCR产物经DNA Fragment Purification Kit试剂盒回收,然后用*Xho* Ⅰ和*Eco*R Ⅰ双酶切并再次使用DNA Fragment Purification试剂盒回收,回收的目的片段克隆至PCI-GFP-miR质粒中,挑取阳性克隆酶切验证,并送宝生物公司测序。用*Asc* Ⅰ和*Bam*H Ⅰ双酶切PCI-GFP-miR-shRNA质粒并切胶回收,回收的目的片段GFP-miR-shRNA与FUW慢病毒载体质粒重组,并转化至DH5α感受态细胞中,挑取阳性克隆,用*Eco*R Ⅰ和*Xba* Ⅰ酶切验证,并送宝生物公司测序。

1.2.3 慢病毒重组体的制备 转染前24 h,在10 cm培养皿中铺(2~3)×10^6的293FT细胞。待细胞汇合率达60%~70%时即可用于转染。将6 μg pMD2.G、15 μg psPAX2和20 μg FUW-GFP-miR-shRNA混匀于无菌去离子水中至终体积为1 095 μl,加入155 μl 2 mol/L $CaCl_2$,然后滴加1 250 μl 2×HBS,边滴加边混匀,滴加完毕后静置1~2 min,待沉淀形成后滴加到培养293FT的10 cm培养皿中。培养7~11 h后,吸去上清,加入10 ml新鲜的含10%小牛血清的DMEM,继续培养48 h。收集上清,1 000 r/min离心10 min,0.45 μm滤器过滤后的病毒液以20 000×*g*离心6 h,弃去上清,用HBSS重悬沉淀,然后将重悬液置于含有20%蔗糖的HBSS溶液上,50 000×*g*离心2 h,弃去上清,用适量HBSS重悬后,分装成小管置于-70 ℃备用。在接种有293FT细胞的6孔板中每孔加入一定量的病毒液(将病毒液倍比稀释1 000倍后),感染48 h后,用流式细胞仪分析绿色荧光细胞的百分比,取百分比在20%以下的计算滴度(TU/ml)。

1.2.4 细胞培养及肝细胞生长曲线测定 取新生的FVB/N小鼠断颈致死,取新鲜的肝脏采用组织块酶消化法进行小鼠肝细胞的原代培养。待细胞长出并传代成功后,用含10%的胎牛血清的RPMI1640培养基,在37 ℃、5% CO_2的培养箱内培养,用0.25%胰酶和0.02% EDTA的混合液消化传代。按每个25 cm^2培养瓶5×10^5/ml作传代培养接种细胞,共接种12瓶细胞。置于37 ℃、5% CO_2孵育箱分别培养3、5、7、9 d,每隔24 h计数1次,每次取3瓶细胞,分别进行计数,连续计数4次,计算平均值。根据细胞计数结果,以单位细胞数(细胞数/ml)为纵坐标,以时间为横坐标绘制生长曲线,以确定最佳转染时间[8]。独立重复实验5次,以验证实验结果。

1.2.5 半定量RT-PCR检测P450 3A11 mRNA的表达 用制备的3种慢病毒转染处于对数生长期的肝细胞,48 h后,各取200个左右细胞使用CellAmp™ Whole Transcriptome Amplification Kit试剂盒提取从少数细胞直接反转录合成cDNA,然后对反转录的cDNA进行扩增,检测肝细胞中P450 3A11 mRNA的表达情况。将扩增得到的cDNA稀释10倍后,各取2 μl cDNA作为模板配成25 μl的反应体系进行PCR反应。CYP3A11基因mRNA检测引物:正义链:5′-CTCAATGGTGTGTATATCCCC-3′,反义链:5′-CCGATGTTCTTAGACACTGCC-3′,预期扩增片段长度为423 bp。小鼠内参基因18S rRNA的引物:正义链:5′-AAATAGCCTTCGCCATCAC-3′,反义链:5′-TCACTCGCTCCACCTCATC-3′,预期扩增片段长度为129 bp。PCR反应条件为:95 ℃预变性5 min,94 ℃变性30 s,54 ℃退火30 s,72 ℃延长40 s,30个循环。最后72 ℃延长8 min,迅速冷却。PCR产物行1%琼脂糖凝胶电泳后凝胶成像仪内观察并照相。使用Bio-Rad公司Quantity One软件分析各样本CYP3A11的灰度值与其对应的18S rRNA灰度值,用CYP3A11 mRNA表达的灰度值/18S rRNA的灰度值来表示mRNA的相对表达量,并计算转染后的干扰效率。独立重复实验3次,以验证试验结果。

1.2.6 显微注射法制作转基因小鼠 取4~6周龄性成熟雌鼠作为胚胎供体,腹腔注射PMSG和HCG进行超数排卵。首日15:00注射PMSG,48 h后注射HCG,每只5~10 IU。随后与公鼠合笼,次日挑选出现阴栓的作为胚胎供体,杀鼠取胚。取胚时,小心剪下输卵管,置于M-2培养液里涮洗2次。于解剖显微镜下将输卵管壶腹部用显微镊撕开,通过轻压输卵管将包裹着胚胎的细胞团挤出。然后加50 μl(0.6 mg/ml)透明质酸酶与1滴M-2培养液(约100 μl)混匀,用移液枪反复吹吸加速细胞团分散。在解剖显微镜下将游离的胚胎细胞捡出[9-12]。在显微注射仪上,将病毒液注射至透明带以下,至见到透明带稍膨大即取针进行下一枚卵的注射。注射后的胚胎重新移回M-16培养液培养[12]。次日选发育良好的22细胞期胚胎显微注射并进行移植。采用输卵管壶腹部穿刺移植法,将含有胚胎的M22段吹入壶腹部,见壶腹部出现2个气泡则表明胚胎进入正确位置[13,14]。将得到的F0代小鼠,在普通紫外灯照射下通过滤光片筛选荧光阳性小鼠。

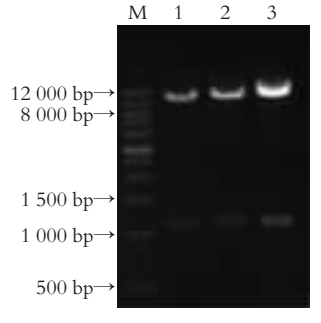
1.3 统计学分析

结果用$\bar{x} \pm s$表示,采用SPSS 10.0统计软件行组间t检验。

2 结果

2.1 miR RNAi慢病毒表达载体的鉴定与测序

用*Xba* Ⅰ和*Eco*R Ⅰ双酶切鉴定3个FUW-GFP-MiR-shRNA慢病毒载体。可切得大小约为1 100 bp和9 600 bp的2个片段(图1),与预计大小相符。将重组的3个慢病毒载体FUW-GFP-MiR-shRNA送宝生物公司测序,测序结果通过软件对比与设计序列完全一致。

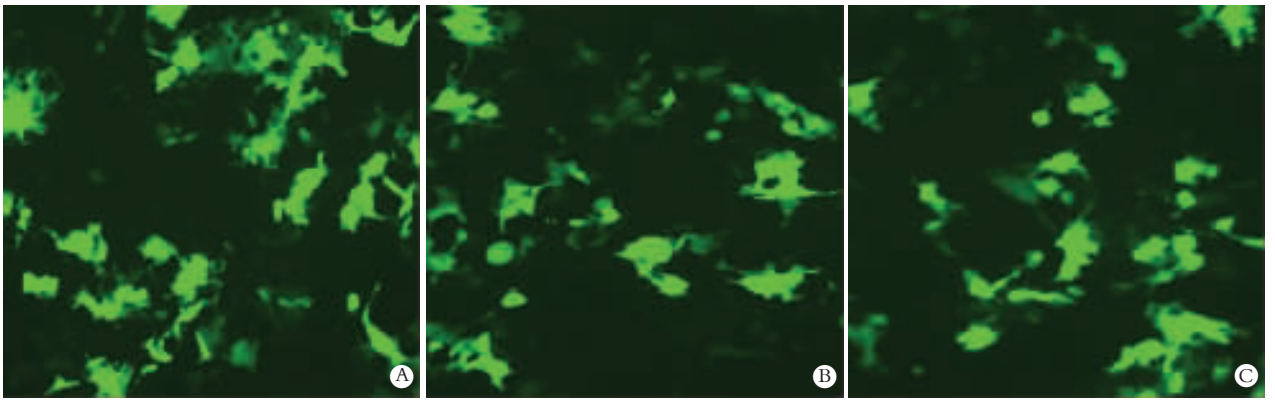


M:Wide range marker;1:FUW-GFP-MiR-shRNA1 质粒;2:FUW-GFP-MiR-shRNA2 质粒;3:FUW-GFP-MiR-shRNA-NC 质粒

图1 miR RNAi表达载体*Xba* Ⅰ与*Eco*R Ⅰ双酶切鉴定

2.2 慢病毒颗粒的制备与滴度测定

将慢病毒包装质粒混合物和重组的P450 3A11基因慢病毒载体包装慢病毒,用磷酸钙沉淀法将3质粒共转染293FT细胞,换液后48 h收集病毒上清,用浓缩后的病毒液稀释1 000倍后转染293FT细胞,48 h后均可见细胞出现绿色荧光(图2)。流式细胞仪测定3个慢病毒的病毒滴度,滴度分别为5.3×10^6、3.7×10^6、4.6×10^6 TU/ml,则浓缩后病毒滴度均能达到10^9 TU/ml,滴度能够满足感染胚胎的要求。



A:FUW-GFP-MiR-shRNA1 慢病毒;B:FUW-GFP-MiR-shRNA2 慢病毒;C:FUW-GFP-MiR-shRNA-NC 慢病毒

图 2　不同病毒转染 293FT 细胞 48 h 后荧光显微镜观察　(×100)

2.3　肝细胞的培养及生长曲线的测定

肝细胞生长曲线显示:第 3 ~ 5 天时细胞生长旺盛,为肝细胞的对数生长期,5 ~ 7 d 细胞生长速度达最高峰,9 d 左右开始出现生长能力减弱,因此慢病毒载体转染细胞一般选择第 3 ~ 5 天进行。见图 3。

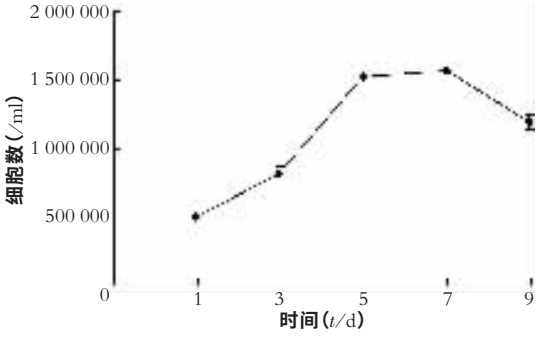
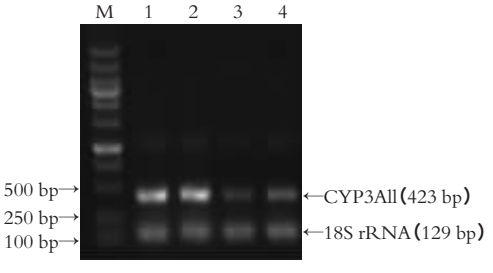


图 3　原代培养肝细胞的生长曲线

2.4　半定量 RT-PCR 检测不同处理组的肝细胞中 P450 3A11 mRNA 表达水平

图 4 可见 MiR-shRNA1 组和 MiR-shRNA2 组的 CYP3A11 mRNA 表达均受到抑制,而 MiR-shRNA1 的抑制效率则可达到(74.9 ± 0.92)%,MiR-shRNA2 可抑制(55.3 ± 1.06)% 以上 CYP3A11 基因的表达,与空白对照组和阴性对照组比较均有显著差异($P < 0.05$)。其中 MiR-shRNA1 组抑制效率最高,与 MiR-shRNA2 组相比具有显著性差异($P < 0.05$)。

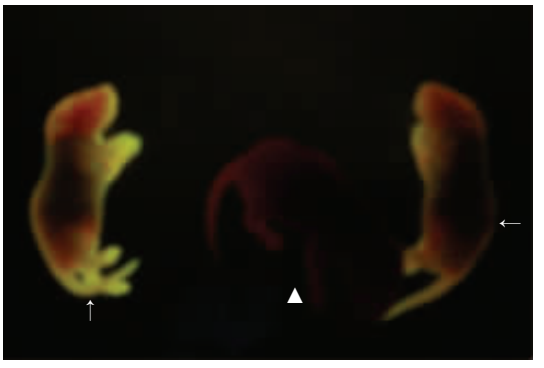


M: Wide range marker(100 ~ 6 000 bp);1:空白对照组;2:FUW-GFP-MiR-shRNA-NC 阴性对照组;3:FUW-GFP-MiR-shRNA1 组;4:FUW-GFP-MiR-shRNA2 组

图 4　半定量 RT-PCR 检测转染后 48 h CYP3A11 mRNA 水平的变化

2.5　GFP 在转基因小鼠传代中的表达

F0 代小鼠在普通紫外灯照射下,通过滤光片可见阳性小鼠出现较强的荧光,阴性小鼠则观察不到明显的荧光。见图 5。



↑:阳性;▲:阴性

图 5　紫外灯照射下(加滤光片)观察 CYP3A11 基因 knock-down 小鼠活体荧光

3　讨论

基于 miRNA 的 RNAi 是一项快速、高效和便于操作的使靶基因失活的新技术,已经逐渐成为一种具有潜力的基因功能研究技术[15]。本实验选取的 PCI-GFP-MiR 载体是在 pPRIME-TREX-GFP-FF3 慢病毒载体的基础上改造而成,该表达载体采用 TREX 启动子,能够高效地促进目的基因的表达和转录。该载体含有一个以 miR30 结构为基础的 shRNA 茎环结构 FF3。FF3 茎环结构能够通过 *Eco*R Ⅰ/*Xho* Ⅱ 双酶切而被其他任何的茎环结构所替代。shRNA 茎环结构通过细胞内特异性核酸内切酶 Dicer 的作用,生成发夹状的单链 miRNA 分子,该 miRNA 分子能特异性结合靶序列,从而降解靶 mRNA,阻止其蛋白翻译,最终实现 RNA 干扰。此外,PCI-GFP-MiR 载体 TREX 启动子下游还带有 GFP 基因,与干扰序列在小鼠体内共表达,

因此可以直观和真实地反映 RNA 干扰的效率和程度。

慢病毒(lentivirus)载体是以 HIV-1(人类免疫缺陷Ⅰ型病毒)为基础发展起来的,是逆转录病毒载体的一种,但又区别一般的逆转录病毒载体。它既具有逆转录病毒的基本结构,但也有一些与一般逆转录病毒不同的组分和特性,其最初用于基因治疗,目前慢病毒载体已被广泛地应用于表达 RNAi 的研究中。通过慢病毒构建的 shRNA 载体,与化学合成的 siRNA 和基于瞬时表达载体构建的 shRNA 相比,不仅能扩增替代瞬时表达载体使用,而且 lentivirus-shRNA 克隆经过慢病毒包装系统包装后,可高效感染那些依靠传统转染方法难于转染的细胞系如原代细胞、悬浮细胞、干细胞和处于非分裂状态的细胞,并且感染后可以将外源基因有效地整合到宿主细胞的基因组中,从而达到持久性表达[16]。慢病毒载体的安全性始终是大家关注的问题,在本实验中我们采用的慢病毒包装系统属于第3代慢病毒载体,除了删去了 HIV 的所有附属基因,还进一步剔除了 HIV 的主要致病元件,如删除了 U3 区的 3′LTR 和 tat 基因,安全性更高。

本研究设计了2条不同的靶向干扰序列和1条阴性对照序列,通过构建 microRNA 干扰载体与慢病毒质粒包装,从而获得了具有感染性的病毒液,病毒滴度可达 10^9 TU/ml。并通过测定肝细胞生长曲线以保证在对数生长期内转染 FVB/N 小鼠肝细胞,然后检测肝细胞中的 CYP3A11 mRNA 表达量,筛选具有高效率干扰效率的 microRNA 分子。最后通过显微注射 shRNA1 制备出 CYP3A11 基因沉默小鼠。本研究结果表明,在 mRNA 表达水平,2条靶向序列均能显著抑制 CYP3A11 mRNA 的表达,转染后 48 h 半定量 RT-PCR 检测显示 shRNA1 组 mRNA 的表达较空白对照组和阴性对照组明显降低($P<0.05$),其抑制效率最高,因此我们筛选效率最高的 shRNA1 作为进行小鼠体内干扰的序列。利用该病毒感染胚胎,将感染后胚胎移植于假孕母鼠输卵管后,出生的首建小鼠中约有 54.7% 的个体为 GFP 阳性。最终成功地以 shRNA1 慢病毒载体建立了 CYP3A11 基因 knock-down 小鼠。

综上所述,本研究结果表明慢病毒介导的 microRNA 干扰载体在转染 FVB/N 小鼠肝细胞后,可以特异性抑制 P450 3A11 的表达,并建立了稳定抑制 P450 3A11 表达的基因 knock-down 小鼠品系,为构建小鼠 P450 3A 亚家族其他基因的干扰载体并为最终制备 CYP3A 亚家族人源化小鼠奠定了基础。

参考文献:

[1] Down M J, Arkle S, Mills J J. Regulation and induction of CYP3A11, CYP3A13 and CYP3A25 in C57BL/6J mouse liver[J]. Arch Biochem Biophys, 2007, 457 (1): 105 – 110.

[2] Zhang H, Wu X, Wang H, *et al*. Effect of pregnancy on cytochrome P450 3a and P-glycoprotein expression and activity in the mouse: mechanisms, tissue specificity, and time course[J]. Mol Pharmacol, 2008, 74(3): 714 – 723.

[3] van-Herwaarden A E, Wagenaar E, van-deR-Kruijssen C M, *et al*. Knockout of cytochrome P450 3A yields new mouse models for understanding xenobiotic metabolism[J]. J Clin Invest, 2007, 117 (11): 3583 – 3592.

[4] Martignoni M, de-Kanter R, Grossi P, *et al*. An *in vivo* and *in vitro* comparison of CYP gene induction in mice using liver slices and quantitative RT-PCR [J]. Toxicol In Vitro, 2006, 20(1): 125 – 131.

[5] Jarukamjorn K, Sakuma T, Jaruchotikamol A, *et al*. Modified expression of cytochrome P450 mRNAs by growth hormone in mouse liver [J]. Toxicology, 2006, 219(1 – 3): 97 – 105.

[6] Martignoni M, Groothuis G, de-Kanter R. Comparison of mouse and rat cytochrome P450-mediated metabolism in liver and intestine[J]. Drug Metab Dispos, 2006, 34(6): 1047 – 1054.

[7] He L, Hannon G J. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation[J]. Nat Rev Genet, 2004, 5(7): 522 – 531.

[8] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版公司, 2007: 68 – 71, 175 – 177.

[9] 刘勤, 张晋宇, 王露露, 等. 慢病毒载体介导的增强型绿色荧光蛋白转基因小鼠的建立[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(10): 885 – 889.

[10] 纳吉 A, 文特斯藤 C, 贝林杰 R. 小鼠胚胎操作实验手册[M]// 孙青原, 陈大元, 译. 北京: 化学工业出版社, 2006: 251 – 256.

[11] 魏泓. 医学实验动物学[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1999: 451 – 456.

[12] 王龙, 杨桦, 徐国江, 等. 显微注射法制备遗传工程小鼠模型的研究[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23 (11): 63 – 67.

[13] Brinster R L, Chen H Y, Trumbauer M E, *et al*. Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985, 82 (13): 4438 – 4442.

[14] Hasegawa A, Mochida N, Ogasawara T, *et al*. Pup birth from mouse oocytes in preantral follicles derived from vitrified and warmed ovaries followed by *in vitro* growth, *in vitro* maturation, and *in vitro* fertilization [J]. Fertil Steril, 2006, 86 (Suppl 4): 1182 – 1192.

[15] Boden D, Pusch O, Silbermann R, *et al*. Enhanced gene silencing of HIV-1 specific siRNA using microRNA designed hairpins [J]. Nucleic Acids Research, 2004, 32(3): 1154 – 1158.

[16] Nishitsuji H, Ikeda T, Miyoshi H, *et al*. Expression of small hairpin RNA by lentivirus-based vector confers efficient and stable gene-suppression of HIV-1 on human cells including primary non-dividing cells [J]. Microbes Infect, 2004, 6(1): 76 – 85.

(**收稿**:2009-09-22;**修回**:2009-11-10)

(编辑 汪勤俭)