基础研究 DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2011.11.008

干扰原代 Leydig 细胞糖皮质激素受体表达的重组腺病毒构建研究

陈 勇

（福建医科大学基础医学院人体解剖与组织胚胎学系，福州 350108）

【摘 要】目的：获得可对原代大鼠 Leydig 细胞的糖皮质激素受体（Glucocorticoid receptor，GR）产生干扰作用的含 miRNA 的重组腺病毒。方法：首先设计并构建针对大鼠 GR 基因的 4 对 miRNA 表达载体，将此 4 种 miRNA 表达载体经脂质体转染大鼠胚胎成纤维细胞（Rat embryonic fibroblast，REF），Western blot 分析 GR 的表达变化，筛选出干扰效果最佳的 miRNA 表达质粒。其次通过 BP 重组和 LR 重组，构建重组腺病毒质粒。最后将重组腺病毒质粒转染 293A 细胞，包装扩增并检测腺病毒滴度，将合适滴度的重组腺病毒感染原代大鼠 Leydig 细胞，Western blot 法检测重组腺病毒干扰原代大鼠 Leydig 细胞 GR 表达的效果。结果：重组腺病毒感染 Leydig 细胞的效率可达 80%，与对照组相比，感染重组腺病毒的 Leydig 细胞，其 GR 蛋白表达显著减少。结论：本研究成功构建重组腺病毒，证实其对原代大鼠 Leydig 细胞中 GR 的表达具有特异性干扰效应。

【关键词】糖皮质激素受体；RNA 干扰；重组腺病毒；Leydig 细胞

【中国图书分类法分类号】Q78 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-04-16

Construction of recombinant adenoviruses expressing microRNA against rat GR in primary rat Leydig cells

CHEN Yong

(*Department of Anatomy and Histology & Embryology, College of Basic Medicine, Fujian Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To construct the recombinant adenoviruses containing microRNA against rat GR. *Methods*: We designed and synthesised four pairs of oligonucleotide-encoding microRNA against rat GR and cloned them into pcDNA™ 6.2-GW/EmGFPmiR to generate expression vectors.The vectors were transfected into rat embryonic fibroblast to detect the effect of interference for initial screening through Western blot.Then the adenoviral expression constructs were generated through BP reaction and LR recombination reaction.The resulting constructs were transfected into 293A cells to package infective adenoviruses.After several rounds of repeated infection of 293A cells, the adenoviruses were amplified to the appropriate titer.The adenoviruses were infected into Leydig cells. Western blot was performed to analysis for knockdown of GR. *Results*: Leydig cells were efficiently infected with recombinant adenovirus.The rate of infection was 80%.GR expression in Leydig cells infected with miGR adenoviruses (the adenoviruses containing microRNA against rat GR) was significantly decreased compared with that in the Leydig cells of control group. *Conclusion*: The recombinant miGR adenovirus can effectively interfere with the GR expression in primary rat Leydig cells.

【Key words】glucocorticoid receptor; RNA interference; recombinant adenoviruses; Leydig cells

糖皮质激素受体（Glucocorticoid receptor，GR）是配体诱导的转录因子超家族成员之一，可以控制诸如代谢、生长发育和生殖等许多生理功能。未结合配体的 GR 通常定位于胞浆中，但一旦与配体如皮质激素结合后就会快速地移入细胞核，通过增加或减少靶基因的表达来产生效应[1,2]。由于体内的糖皮质激素发挥作用是经 GR 介导的[3,4]，抑制 GR 表达对于探讨 GR 依赖的进程非常重要。为探讨糖皮质激素影响发育、内环境稳定、细胞增生、细胞分化和细胞凋亡等一系列生物学活动机制的问题，有必要寻找一种可靠有效抑制 GR 表达的途径。

原代大鼠 Leydig 细胞（能合成分泌雄激素）是研究雄性生殖功能最常用的细胞模型，鉴于前述 GR 与糖皮质激素之间的关系，通过观察干扰 Leydig 细胞 GR 的表达后其一系列生理功能的变化，可以帮助从分子水平进一步评价和证实与内源性糖皮质激素升高有关的疾病，如慢性应激、库欣综合征等对 Leydig 细胞功能的影响，即对雄性生殖功能的损伤机制。为此本研究拟构建能特异高效干扰大鼠 Leydig 细胞 GR 表达的含 miRNA 的重组腺病毒，为进一步探索与内源性糖皮质激素升高有关的疾病，对雄性生殖功能的影响机制提供一个有利的研究工具。

作者介绍：陈 勇（1974-），男，讲师，博士，研究方向：生殖内分泌。

基金项目：福建省自然科学基金资助项目（编号：2010J01176）。

1 材料与方法

1.1 材料及实验动物

BLOCK-iT™ Pol Ⅱ miR RNAi Expression Vector Kit with EmGFP、pcDNA™ 6.2-GW/EmGFPmiR、Lipofectamine2000、opti-MEM、platinum pfx polymerase、BP 重组系统和 LR 重组系统、高糖 DMEM 培养基、M199、DMEM/F12、BSA、胎牛血清、0.25%胰酶-0.03%乙二胺四乙酸(Ethylene diamine tetraacetic acid,EDTA)、100×的青链双抗均购自 invitrogen 公司；质粒抽提试剂盒和 DNA 凝胶回收试剂盒均购自 Axygen 公司；DH5α 购自上海吉泰生物科技有限公司；QuickTiter™ Adenovirus Titer Immunoassay Kit 购自 Cell Biolabs 公司；Percoll 购自瑞士 GE Healthcare 公司；Ⅲ型胶原酶购自美国 Boehringer Mannhem 公司；RIPA 和 PMSF 购自上海申能博采；BCA Protein Assay Kit 购自 PIERCE 公司；ECL 试剂盒及硝酸纤维素膜购自英国 Amersham Biosciences 公司；多克隆兔抗鼠 GR 抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔 IgG 抗体均购自美国 Santa Cruz 公司；GAPDH antibody 购自 Cell signaling 公司。

大鼠胚胎成纤维细胞(Rat embryonic fibroblast,REF)购自美国 ATCC 公司；90 d 龄雄性 SD 大鼠购自中国科学院上海实验动物中心。

1.2 miRNA 表达载体的构建

由 invitrogen 公司根据专门软件设计并合成针对大鼠 GR 基因的 4 对干扰 oligonucleotide(oligo)，其序列如下：

SR43-1F:TGCTGATCATATCCTGCATACAACACGTTTTGGCCACTGACTGACGTGTTGTACAGGATATGAT；

SR43-2F:TGCTGAGACATTTCCGATAGCGGCATGTTTTGGCCACTGACTGACATGCCGCTCGGAAATGTCT；

SR43-2R:CCTGAGACATTTCCGAGCGGCATGTCAGTCAGTGGCCAAAACATGCCGCTATCGGAAATGTCTC；

SR43-3F:TGCTGATAAGAGGCTTACAATCCTCAGTTTTGGCCACTGACTGACTGAGGATTAAGCCTCTTAT；

SR43-3R:CCTGATAAGAGGCTTAATCCTCAGTCAGTCAGTGGCCAAAACTGAGGATTGTAAGCCTCTTATC；

SR43-4F:TGCTGTACAATTTCACACTGCCTCCGGTTTTGGCCACTGACTGACCGGAGGCAGTGAAATTGTA；

SR43-4R:CCTGTACAATTTCACTGCCTCCGGTCAGTCAGTGGCCAAAACCGGAGGCAGTGTGAAATTGTAC。

将 8 份合成好的 oligo 用 ddH_2O 溶解成 100 μmol/L，互补单链各取 5 μl 两两混合，按 20 μl 体系进行退火，将 4 份 oligo 混合物在 95℃加热 5 min，然后放置室温自然冷却 20 min，形成 ds oligo。将退火的 ds oligo 继续稀释成 10 nmol/L 浓度，按以下体系进行连接(5×ligation buffer 4 μl；pcDNA 6.2-GW/EmGFP 2 μl；ds oligo (10 nmol/L)4 μl；T4 DNA ligase(1 U/μl)1 μl；ddH_2O 9 μl)，室温连接 30 min 以后，可进行转化反应。取 5 μl 连接液加入 100 μl 的 DH5α 感受态细胞中进行转化，最后将细胞涂布于含 50 μg/ml 壮观霉素的 LB 平板，平板倒置于 37℃培养箱中过夜培养。每个平板分别挑取 4 个克隆在 3 ml 的含 50 μg/ml 壮观霉素的 LB 培养基中，摇床上 37℃，230 r/min 培养 14 h。取 2 μl 培养的菌液做菌落 PCR 鉴定，使用载体通用测序引物进行 PCR。取 2 ml 保留的阳性克隆菌液用质粒抽提试剂盒进行抽提。对抽提的质粒进行测序验证。

1.3 miRNA 表达载体的筛选

REF 在 37℃、5%CO_2-95%空气湿度条件下，于 REF 培养液(含 10%胎牛血清并含青霉素 100 U/ml 和链霉素 100 mg/ml的高糖 DMEM 培养基)中进行培养。经 0.25%胰酶-0.03% EDTA 消化传代，于倒置显微镜下观察细胞状态。在转染前 1 d，将 REF 按 1×10^5 个/孔铺至 6 孔板中。在转染当天，REF 长满约 85%。按 Lipofectamine2000 说明书混合脂质体和 4 种 miRNA 表达质粒(10 μl 脂质体混合 4 μg 质粒)，并加入对应的孔中，空白对照补加 500 μl opti-MEM。前后左右振摇混匀后，将 6 孔板放入 37℃ 5%的 CO_2 培养箱中继续培养，5 h 后换液。在转染 48 h 后抽取各孔 REF 的总蛋白，进行 Western blot 分析：弃培养液，各孔用预冷的 PBS 清洗 3 次，每孔加入含苯甲基磺酰氟 (Phenylmethanesulfonyl fluoride,PMSF)的 RIPA 裂解液 100 μl，冰上裂解 30 min，20 000 g 4℃离心 30 min，取上清液，BCA 法进行蛋白定量。以 8%SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离，湿法转移至 NC 膜，室温下用封闭液封闭 1.5 h 后加入一抗(将 GR 一抗按 1:250 稀释，将内参 GAPDH 抗体按 1:1 000 稀释)4℃孵育过夜，PBST 洗涤后再将 NC 膜放入含有二抗(HRP 耦联的二抗按 1:1 000 稀释)的 5%脱脂奶粉中室温下孵育 1 h，化学发光法显色，X 射线底片曝光。应用 Quantity One 软件半定量分析 Western blot 条带吸光度，相对表达量以各样本条带吸光值与内参 GAPDH 条带吸光度值的比值计算。选择干扰效果最佳的 miRNA 表达质粒用于后续腺病毒载体构建实验。

1.4 腺病毒载体的构建

1.4.1 PCR 扩增重组片段 根据 pcDNA™ 6.2-GW/EmGFP-miR 载体序列在 attB1 和 attB2 的两侧设计 PCR 引物，引物序列如下：Primer F 5'-CCCAAGCTGGCTAGTTAAGC-3'，Primer R 5'-TCCTTCCGTGTTTCAGTTAGC-3'。以构建好的最佳的 miRNA 表达质粒为模板，按 50 μl 体系使用 platinum pfx polymerase 进行重组片段的扩增，PCR 反应条件：95℃ 3 min；94℃ 30 s、56℃ 30 s、68℃ 1 min 35 个循环；68℃ 10 min。用 Axygen 公司的 DNA 凝胶回收试剂盒回收 PCR 产物。

1.4.2 BP 重组反应 BP 重组反应体系(attB PCR 产物 2 μl；pDONR221 vector 1 μl；BP clonase Ⅱ enzyme mix 2 μl；ddH_2O 5 μl) 于 25℃反应 1 h，加入 1 μl 的蛋白酶 K，37℃反应 10 min，取 5 μl 重组反应液转化 100 μl 的 DH5α 感受态细胞。感受态细胞涂布于含有 50 μg/ml 卡那霉素的 LB 平板，37℃过夜培养，从平板挑单克隆接种于 4 ml 含 50 μg/ml 卡那霉素的 LB 液体培养基中，37℃，220 r/min 过夜培养，用 Axygen 质粒 DNA 小量试剂盒提取质粒。质粒测序验证。

1.4.3 LR 重组反应 LR 重组反应体系(BP 重组质粒 1 μl；pAD/CMV/V5-DEST 1 μl；LR clonase Ⅱ enzyme mix 2 μl；ddH_2O 6 μl)处理步骤同 BP 重组反应，只是将 LB 的抗性改为 100 μg/ml 氨苄青霉素。

1.5 重组腺病毒的包装扩增及滴度测定

重组质粒 *Pac* Ⅰ单酶切，37℃酶切过夜，采用经典酚氯仿抽提法对单酶切质粒进行纯化。用 0.25%胰酶消化培养瓶中的 293A 细胞，得到细胞悬液后，转种于 6 孔板，每孔 5×10^5 个细胞；加入 2 ml 完全培养液继续孵育细胞 24 h，使细胞达到贴壁覆盖率 70%~80%左右，按 Lipofectamine2000 操作说明书将重组腺病毒质粒转染 293A 细胞；转染后 48 h 消化细

胞转移至 10 cm 培养皿中，皿中加入 10 ml 完全培养基；每 2 d 换入新鲜培养基，直至有细胞病变效应（Cytopathic effect，CPE）出现；加满培养液让感染继续发生，直至 80%CPE 出现；收集细胞及培养液至灭菌的 15 ml 离心管，-80℃ 保存。用反复冻融法（-80℃，30 min，随后置于 37℃ 15 min）使病毒从细胞中释放出来，离心收集。收集得到的病毒按 1 ml/管分装，-80℃ 保存。病毒感染前 1 d 对 293A 细胞进行计数，在 10 cm 培养皿中以 3×10^6 个细胞种板，以保证转导时细胞密度达到 80%~90%，感染时在 10 cm 皿中加入 100 μl 初级病毒液，轻轻混匀，在 37℃，5% 的 CO_2 的培养箱中培养至 80%~90%细胞变圆并漂浮，收集细胞至灭菌的 15 ml 离心管。将收集的细胞同前反复冻融 3 次使病毒从细胞中释放出来。室温下 3 000 r/min 离心 15 min，除去细胞碎片。上清按 1 ml/管分装，-80℃保存。待测病毒样品按 QuickTiter™ Adenovirus Titer Immunoassay Kit 说明书免疫法测定病毒液的滴度。

1.6 重组腺病毒干扰大鼠 Leydig 细胞 GR 表达的验证实验

1.6.1 确定最佳的感染复数（Multiplicity of infection，MOI）

Percoll密度梯度离心法分离90 d龄SD大鼠的Leydig细胞[5]，分离 Leydig 细胞的纯度用 3β-HSD 组化染色鉴定[6]，平均纯度可达 90%。按照 5×10^5 个/孔接种于 12 孔板中，所用的培养液是含 1 mg/ml BSA、1×双抗的 DMEM/F12 即 LCM，在感染病毒当天，解冻保存于-80℃冰箱中的病毒样品原液，按 MOI 分别为 0、10、50、100、200、300 先在 1.5 ml EP 管中用 LCM 稀释病毒样品原液，用 tip 头轻轻吹打混匀。吸弃各孔的培养液，按 MOI 由低到高的顺序分别加入含有病毒的培养液，轻轻振摇培养板，放入 34℃、5%CO_2 培养箱培养过夜，次日早晨换液。在 Leydig 细胞感染病毒 48 h 后，在荧光显微镜下观察，选择发绿荧光的 Leydig 细胞比例最高且细胞状态保持最佳的 MOI 进行后续的验证实验。

1.6.2 Western blot 检验重组腺病毒干扰原代大鼠 Leydig 细胞 GR 表达的效果

同前分离 90 d 龄 SD 大鼠的 Leydig 细胞，按照 1×10^6 个/孔接种于 6 孔板中，分为 3 组即空白对照组、干扰 GR 的重组腺病毒组、对照病毒组。Leydig 细胞培养 48 h 贴壁后，于第 2、3 组中分别加入 MOI 均为 200 的重组腺病毒和对照病毒。于 34℃、5%CO_2 培养箱培养过夜，次晨换液。在 Leydig 细胞感染病毒后第 3 天用 RIPA 裂解细胞，抽取各组的总蛋白，BCA 法蛋白定量，Western blot 分析各组 Leydig 细胞的 GR 表达变化。

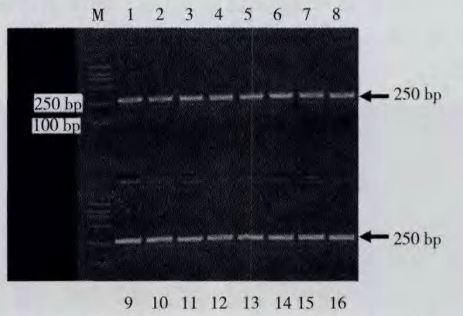
1.7 统计学分析

以上实验均重复 3 次，将 Western blot 图片扫描并保存为 TIF 格式的电脑文件，并用 Quantity One 分析软件将图片上每个特异条带灰度值数字化。目的蛋白的灰度值除以内参 GAPDH 的灰度值以校正误差，所得结果（比值）就代表该样品的目的蛋白相对含量（表达量）。采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析，计量数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示，各组细胞之间目的蛋白（GR）的表达量比较采用单因素方差分析。$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 PCR 鉴定 miRNA 表达载体的阳性克隆

如图 1 所示，miRNA 表达载体阳性克隆 PCR 产物约为 250 bp，其电泳图谱见图 1。

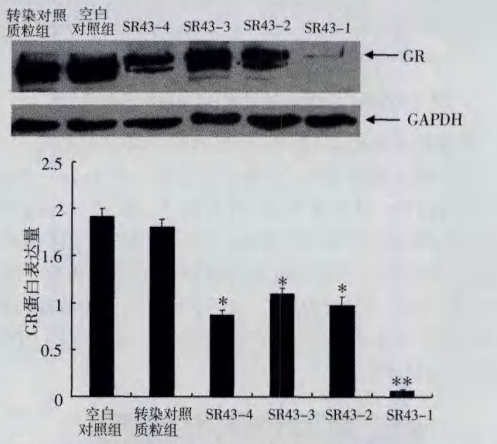


M. marker；1~4. SR43-1；5~8. SR43-2；9~12. SR43-3；13~16. SR43-4

图 1 PCR 鉴定 miRNA 表达载体阳性克隆的电泳图谱

2.2 经 Western blot 分析筛选 4 种 miRNA 表达质粒的干扰效果

如图 2 所示，与空白对照组和对照质粒组相比，转染 miRNA 表达质粒的 4 组细胞其 GR 蛋白表达量均显著减少（$P<0.05$），其中含 SR43-1 的这对干扰序列的表达质粒对 GR 的干扰效果最好（与其他各组相比均 $P<0.05$），其后依次是 SR43-4、SR43-2、SR43-3；而对照质粒对 GR 表达量差异无统计学意义（$P>0.05$）。表 1 是各组 REF 的 GR 蛋白表达量的具体数据。



*：该组 GR 蛋白表达量与空白对照组和对照质粒组相比，$P<0.05$；**：该组 GR 蛋白表达量与其他各组比较，$P<0.05$

图 2 Western blot 分析 4 种 miRNA 表达质粒的干扰效果

表 1 空白对照 REF 与转染了质粒的各组 REF 的 GR 蛋白表达量

（$\bar{x}\pm s$）（n=3）

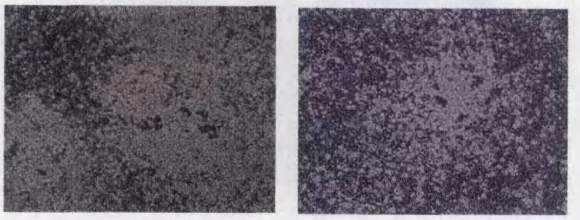
组别	GR蛋白表达量
空白对照组	1.920 7 ± 0.079 0
转染对照质粒组	1.802 0 ± 0.084 5
SR43-4	0.867 7 ± 0.055 2*
SR43-3	1.093 7 ± 0.061 6*
SR43-2	0.971 0 ± 0.093 6*
SR43-1	0.071 0 ± 0.013 2**

注：SR43-4、SR43-3、SR43-2、SR43-1 是分别转染了相应 miRNA 表达质粒的各组 REF；★：该组 GR 蛋白表达量与空白对照组和对照质粒组相比，$P<0.05$；★★：该组 GR 蛋白表达量与其他各组比较，$P<0.05$

2.3 重组腺病毒和对照病毒的包装、扩增及滴度测定结果

2.3.1 转染后 13 d 细胞出现 CPE 情况(观察出现的病毒斑)

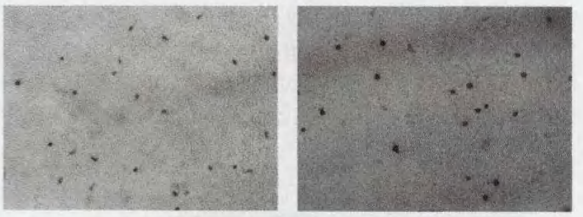
如图 3 所示,293A 细胞转染重组质粒后 13 d 出现明显病变效应。



A. 重组病毒样品　　B. Ad-GFP

图 3　293A 细胞转染重组质粒后 13 d 出现的细胞病变效应

2.3.2 腺病毒滴度测定　如图 4 所示,经免疫细胞化学染色后,感染病毒的细胞出现明显的棕色反应产物。根据公式可计算出腺病毒的滴度。所得病毒液的滴度分别为:重组病毒是 8.6×10^{10} IFU/ml;对照病毒 Ad-GFP 是 7.0×10^{10} IFU/ml。



A. 重组病毒样品　　B. Ad-GFP

图 4　腺病毒滴度测定结果(病毒稀释倍数为10^6)

2.4 重组腺病毒感染 Leydig 细胞的最佳 MOI 的测定

随着 MOI 逐渐提高,呈现绿荧光的阳性 Leydig 细胞比例呈递增趋势。从结果可知,当 MOI 为 200 时,Leydig 细胞感染腺病毒的阳性率约为 80%,且细胞状态也较佳;MOI 超过 200 时阳性率并没有出现显著增加,且细胞出现死亡脱落、漂浮在培养液上等毒性反应。如图 5 所示为重组腺病毒感染 Leydig 细胞 48 h 后(MOI=200)的荧光照片,故我们采用MOI=200 进行后续实验。

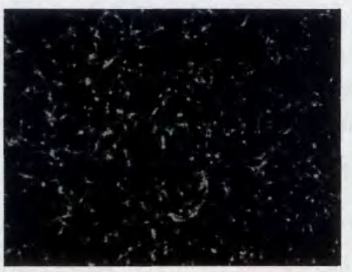
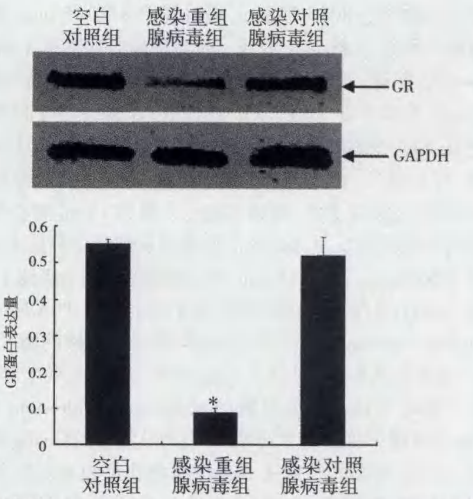


图 5　重组腺病毒感染 Leydig 细胞的最佳 MOI 的测定(MOI = 200)

2.5 Western blot 分析重组腺病毒干扰 Leydig 细胞中 GR 表达的效果

如图 6 所示,与空白对照组及感染对照腺病毒组相比,感染了重组腺病毒的 Leydig 细胞,其 GR 蛋白表达显著减少($P<0.05$),而感染对照腺病毒的 Leydig 细胞其 GR 蛋白表达与空白对照组相比差异无统计学意义($P>0.05$)。表明所构建的重组腺病毒能有效干扰原代大鼠 Leydig 细胞中 GR 的表达。表 2 是各组原代大鼠 Leydig 细胞的 GR 蛋白表达量的具体数据。



*,表示该组 GR 蛋白表达量与空白对照组和感染对照腺病毒组相比,$P<0.05$

图 6　Western blot 分析重组腺病毒干扰 Leydig 细胞中 GR 表达的效果

表 2　腺病毒感染实验中各组原代大鼠 Leydig 细胞的 GR 蛋白表达量($\bar{x}\pm s$)(n=3)

组别	GR蛋白表达量
空白对照组	0.552 3 ± 0.012 0
感染重组腺病毒组	0.088 3 ± 0.012 7*
感染对照腺病毒组	0.521 0 ± 0.049 4

★:该组 GR 蛋白表达量与空白对照组和感染对照腺病毒组相比,$P<0.05$

3　讨　论

RNA 干扰(RNA interferece,RNAi),是指一些小的双链 RNA(Double stranded RNA,ds RNA)通过特异性降解与其同源的 RNA 而高效地阻断体内特定基因表达的现象。由于 RNAi 能特异性地抑制某一基因的表达,因此这种新兴的技术已经被广泛应用于功能基因组学、发育生物学等基础研究领域,以及抗肿瘤、抗病毒等新的治疗或预防性药物的开发中,成为当今的一个研究热点[7]。MicroRNAs(miRNAs)是能与靶 mRNA 的 3'端非翻译区互补序列碱基配对从而在翻译后水平对基因表达进行负调节的内源性小的非编码 RNA(含 20~23 个核苷酸)[8]。传统的向真核细胞导入某种基因或改变基因表达的方法有:磷酸钙介导的转染、脂质体介导的转染和电穿孔法(电转)等[9-11];新近的有腺病毒、慢病毒、逆转录病毒感染等方法[12,13]。由于本研究的对象是成年大鼠 Leydig 细胞,其是原代细胞且不增殖分裂、对脂质体转染等一般的传统方法不敏感,效率极为低下。逆转录病毒对于大多数细胞的感染效率小于 30%,而且依赖细胞的分裂。慢病毒对于

分裂细胞和非分裂细胞只能够达到30%的感染效率。慢病毒和逆转录病毒一样存在整合到宿主细胞基因组上的风险，以致引起基因突变、致癌。由于存在致瘤风险等安全性问题，慢病毒和逆转录病毒对实验室的防护条件要求非常高，在一般防护级别达不到的实验室无法开展此类实验，不具有普遍推广的实践价值。腺病毒针对大多数细胞有几乎 100%的感染效率，包括分裂和不分裂细胞及原代细胞，不整合到宿主细胞。目前腺病毒系统是最好的一种对于所有细胞将外源基因及 siRNA 或 miRNA 导入细胞的有效途径。因此为了能高效地导入针对 GR 的 miRNA 进而干扰 Leydig 细胞的 GR 表达，我们构建可表达针对原代大鼠 Leydig 细胞的 GR 产生干扰作用的 miRNA 的重组腺病毒，采用了含 miRNA 干扰序列的重组腺病毒感染原代大鼠 Leydig 细胞的方法以提高转染效率即本研究利用腺病毒介导的 RNA 干扰抑制原代大鼠 Leydig 细胞 GR 的表达，并验证重组腺病毒干扰原代大鼠 Leydig 细胞 GR 表达的效果。经分析，重组腺病毒感染大鼠 Leydig 细胞的效率约为 80%，说明采用含 MicroRNA 重组腺病毒感染的方法确实优于一般传统方法。Western blot 结果显示：与空白对照组相比，感染了重组腺病毒的 Leydig 细胞，其 GR 的蛋白表达量显著减少，而感染对照病毒的 Leydig 细胞其GR蛋白表达无显著变化。结果表明我们构建的含 miRNA 干扰序列的重组腺病毒能成功抑制大鼠 Leydig 细胞的 GR 基因表达，使其蛋白表达量显著减少。因此本研究成功构建了特异性且高效干扰原代大鼠 Leydig 细胞 GR 表达的重组腺病毒，腺病毒介导的 RNA 干扰抑制 GR 表达的效果非常显著。

有的学者在研究抑制 GR 的功能实验时，采用 GR 的拮抗剂 RU486[14,15]。RU486 虽然是 GR 的拮抗剂，但其毕竟是作用较广泛的人工合成的化学物质，其进入细胞内除了与 GR 竞争性结合发挥拮抗 GR 的功能外，不可避免会对细胞产生其它影响，如 RU486 还能分别与孕酮受体和雄激素受体结合发挥拮抗孕酮受体和拮抗雄激素受体的作用[16-19]。而采用腺病毒介导的 RNA 干扰只影响 Leydig 细胞中 GR 的表达，对 Leydig 细胞中其它基因的表达及细胞的正常生理功能无影响，以至结果更真实、可信；另外 GR 本身表达改变时细胞的变化比用 RU486 竞争性抑制 GR 与糖皮质激素的结合更直接客观更有说服力更能说明问题，故本研究干扰 GR 表达的方法优于 GR 拮抗剂 RU486 的使用。

如前所述 GR 是配体诱导的转录因子超家族成员之一，可以控制诸如代谢、生长发育和生殖等许多生理功能。未结合配体的 GR 通常定位于胞浆中，GR 一旦与配体即糖皮质激素结合，GR 的构相发生变化，形成的糖皮质激素-GR 复合物迅速从胞浆移位进入核内，进而与糖皮质激素反应元件或负性糖皮质激素反应成分相结合，相应地引起某些靶基因的转录增加或减少而产生效应。糖皮质激素发挥作用是由 GR 介导而实现的，研究 GR 的变化可反映糖皮质激素对细胞的影响或分析细胞的某项生理活动过程中是否有糖皮质激素的参与。而且重组腺病毒可适用于体内外研究，因此鉴于 GR 与糖皮质激素之间的关系，干扰原代大鼠 Leydig 细胞 GR 表达的重组腺病毒的成功构建，为进一步研究在 Leydig 细胞的 GR 被干扰表达后的功能实验奠定了基础，进而可为研究与内源性糖皮质激素升高等有关的疾病如慢性不良应激、创伤后应激、库欣综合症等或长期应用糖皮质激素治疗对人体健康（雄性生殖功能）影响的分子机制提供一个有利的平台和工具。

参 考 文 献

[1] Yamamoto K R.Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks[J].Annu Rev Genet,1985,19(1):209-252.

[2] Heitzer M D,Wolf I M,Sanchez E R,et al.Glucocorticoid receptor physiology[J].Rev Endocr Metab Disord,2007,8(4):321-330.

[3] Beato M,Herrlich P,Schütz G.Steroid hormone receptors:many actors in search of a plot[J].Cell,1995,83(6):851-857.

[4] Cole T J,Blendy J A,Monaghan A P,et al.Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation[J].Genes Dev,1995,9(13):1608-1621.

[5] Sriraman V,Rao V S,Sairam M R,et al.Effect of deprival of LH on Leydig cell proliferation:involvement of PCNA,cyclin D3 and IGF-I[J].Mol Cell Endocrinol,2000,162(1-2):113-120.

[6] Payne A H,Downing J R,Wong K L.Luteinizing hormone receptors and testosterone synthesis in two distinct populations of Leydig cells[J].Endocrinology,1980,106(5):1424-1429.

[7] Novina C D,Sharp P A.The RNAi revolution[J].Nature,2004,430(6996):161-164.

[8] Tsuchiya S,Okuno Y,Tsujimoto G.MicroRNA:biogenetic and functional mechanisms and involvements in cell differentiation and cancer[J].J Pharmacol Sci,2006,101(4):267-270.

[9] Strauss W M.Transfection of mammalian cells via lipofection[J].Methods Mol Biol,1996,54(1):307-327.

[10] Weaver J C.Electroporation:a general phenomenon for manipulating cells and tissues[J].J Cell Biochem,1993,51(4):426-435.

[11] Harrison G S,Wang Y,Tomczak J,et al.Optimization of gene transfer using catioinic lipids in cell lines and primary human CD4+ and CD34+ hematopoietic cells[J].Biotechniques,1995,19(5):816-823.

[12] Blanchard K T,Boekelheide K.Adenovirus-mediated gene transfer to rat testis in vivo[J].Biol Reprod,1997,56(2):495-500.

[13] Murakami M,Masuda S,Shimbara S,et al.Cellular distribution,post-translational modification,and tumorigenic potential of human group Ⅲ secreted phospholipase A(2)[J].J Biol Chem,2005,280(26):24987-24998.

[14] Gao H B,Tong M H,Hu Y Q,et al.Glucocorticoid induces apoptosis in rat Leydig cells[J].Endocrinology,2002,143(1):130-138.

[15] Monder C,Miroff Y,Marandici A,et al.11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase alleviates glucocorticoid-mediated inhibition of steroidogenesis in rat Leydig cells [J].Endocrinology,1994,134(3):1199-1204.

[16] Ulmann A.The development of mifepristone:a pharmaceutical drama in three acts[J].J Am Med Womens Assoc,2000,55(s3):117-120.

[17] Ulmann A,Teutsch G,Philibert D.RU486[J].Sci Am,1990,262(6):42-48.

[18] Philibert D,Teutsch G.RU 486 development[J].Science,1990,247(4943):622.

[19] Heikinheimo O,Kekkonen R,Lahteenmaki P.The pharmacokinetics of mifepristone in humans reveal insights into differential mechanisms of antiprogestin action[J].Contraception,2003,68(6):421-426.

（责任编辑：张学颖）