能可以快速经济地进行检测,并能实现基因的定时表达缺陷[5,6],这对于研究有遗传和环境因素共同参与疾病的发病机制具有重要意义。

本课题组在前期研究中,根据 siRNAs 的设计原则[7-9],设计了 3 个编码小鼠 Acrp30 基因的特异性 siRNA 寡核苷酸插入片段,利用 pSilencer1.0-U6 载体构建了 3 个相应的表达质粒,将上述表达质粒转染入诱导分化后的 3T3-L1 脂肪细胞,筛选出两条抑制脂联素表达最有效 siRNA 寡核苷酸片段,将其质粒载体命名为 pSilencer1.0-U6-Acrp30-1 和 pSilencer1.0-U6-Acrp30-3[4]。在此基础上,本研究用 *Kpn* Ⅰ和 *Not* Ⅰ双酶切上述 2 个质粒,将其亚克隆入穿梭质粒 pShuttle,用 *Pme* Ⅰ酶切线性化穿梭质粒,并与骨架质粒 pAdeasy-1 在 BJ5183 细胞内同源重组,最后在 293 细胞内包装为重组腺病毒。

本实验采用的 AdEasy™ XL 腺病毒载体系统是目前基因治疗中应用最广泛的一种载体系统,具有许多优点,如转染效率高,感染的宿主范围广,可以有效地转染分裂和静止期细胞,载体容量大,插入外源基因片段长,目的基因的蛋白在哺乳动物细胞中的表达水平较高,而且携带基因不整合到宿主细胞基因组中,对机体的安全性较高[10,11]。本研究中,我们先将腺病毒质粒载体转化大肠杆菌,再将获得的转化细菌制成感受态细胞,作为重组穿梭质粒载体转化的宿主菌,大大提高了同源重组的效率,在空斑形成实验中测定到了较高的病毒滴度。最后,将上述带有 Acrp30-siRNA 表达框的 2 个重组腺病毒(Ad-Acrp30-1 和 Ad-Acrp30-3)转染入诱导分化后的 3T3-L1 脂肪细胞,并观察了其对脂联素表达的抑制效应。结果表明脂肪细胞脂联素 mRNA 和蛋白表达均受到明显抑制,其抑制率分别为 61%(Ad-Acrp30-1)和 49%(Ad-Acrp30-3),提示本研究设计的 Acrp30-siRNA 寡核苷酸片段能有效阻断 3T3-L1 脂肪细胞脂联素基因的表达。因此,可以认为 Acrp30-siRNA 重组腺病毒载体质粒的构建为研究脂联素与肥胖和胰岛素抵抗的发病机制之间的关系提供了一个高效、经济的技术平台。

参考文献:

[1] Rajala M W, Scherer P E. Minireview: The adipocyte--at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis[J]. Endocrinology, 2003, 144(9): 3765-3773.

[2] Trayhurn P. Endocrine and signalling role of adipose tissue: new perspectives on fat[J]. Acta Physiol Scand, 2005, 184(4): 285-293.

[3] 刘　楼, 许建娟. 妊娠期糖尿病孕妇血清脂联素表达的相关性研究[J]. 实用临床医药杂志, 2007, 11(1): 89-90.

[4] 李　钶, 杨刚毅, 李　伶, 等. RNA 干扰对脂联素在 3T3-L1 脂肪细胞中表达的影响[J]. 中国糖尿病杂志, 2007, 15(10): 589-590.

[5] Yin J Q, Wan Y. RNA-mediated gene regulation system: now and the future (Review)[J]. Int J Mol Med, 2002, 10(4): 355-365.

[6] Zamore P D. Ancient pathways programmed by small RNAs[J]. Science, 2002, 296(5571): 1265-1269.

[7] Harborth J, Elbashir S M, Vandenburgh K, *et al*. Sequence, chemical, and structural variation of small interfering RNAs and short hairpin RNAs and the effect on mammalian gene silencing[J]. Antisense Nucleic Acid Durg Dev, 2003, 13(2): 83-105.

[8] Semizarov D, Frost L, Sarthy A, *et al*. Specificity of short interfering RNA determined through gene expression signatures[J]. Proc Nutl Acad Sci USA, 2003, 100(11): 6347-6352.

[9] Jackson A L, Bartz S R, Schelter J, *et al*. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi[J]. Nat Biotechnol, 2003, 21(6): 635-637.

[10] 孙学刚, 宋　革, 刘靖华, 等. 带 Tat 标记质粒载体的构建及其转导融合蛋白进入细胞的研究[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2003, 19(3): 354-358.

[11] 刘斌剑, 王建民, 陈　林, 等. Bek 腺病毒表达载体的构建及其在哺乳类动物细胞中的表达[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(2): 144-146.

(编辑　王小寒)

《第三军医大学学报》2008 年第 15 期重点内容(关节镜临床治疗专题)预告

关注膝关节镜热点与争议问题 …… 吴海山
重视"三基"训练, 树立微创理念, 立志成为一名合格关节外科医师 …… 杨　柳
关节镜下六股自体胭绳肌肌腱双隧道重建膝前交叉韧带 …… 李卫平, 黄建荣, 沈慧勇, 等
关节镜微创手术治疗膝骨性关节病伴 Baker's 囊肿的价值 …… 刘玉杰, 薛　静, 周　密, 等
54 例关节镜下盘状软骨成形手术的中期随访 …… 祝云利, 吴宇黎, 吴海山
MRI 诊断半月板损伤类型的对比研究 …… 段小军, 杨　柳, 文亚名, 等
关节镜手术治疗髌骨脱位 17 例疗效分析 …… 徐　虎, 张春礼, 范宏斌, 等
6 例膝关节骨滑膜血管瘤的关节镜下诊断及治疗 …… 李　棋, 曹　畅, 李智尧, 等
关节镜下治疗 31 例运动员髌下脂肪垫撞击综合征 …… 覃　健, 侯之启, 郑民庆, 等
应用改良的关节镜下带垫片的空心螺钉内固定技术治疗儿童前交叉韧带胫骨止点撕脱性骨折 …… 胡　勇, 程松苗, 唐　杰
关节镜手术治疗 29 例症状性膝关节外侧盘状半月板 …… 何爱珊, 傅　明, 杨子波, 等