

文章编号 1006-8147(2015)05-0379-06

论 著

血红素氧化酶 1 在 ADSCs 增殖、凋亡和成骨分化的作用

陈晓鹏¹, 胡永成², 方成¹, 张丽娟¹, 张荣信¹, 黄文敬¹

(1.天津医科大学研究生院, 天津 300070; 2.天津市天津医院骨与软组织肿瘤科, 天津 300211)

摘要 目的:探讨应用慢病毒介导血红素氧化酶 1(HO-1)基因转染诱导脂肪来源基质干细胞(ADSCs)后对细胞增殖、凋亡和成骨分化的影响。方法:取健康 10 周龄 SD 大鼠双侧腹股沟脂肪,分离、培养 ADSCs,观察第 3 代细胞形态并进行成骨和成脂分化研究,流式分析细胞表面标记物,确立分离细胞为 ADSCs。利用基因重组技术构建 HO-1 基因重组慢病毒载体,并以 Polybrene (8 μ g/mL)介导慢病毒转染 ADSCs,倒置显微镜下观察转染细胞荧光表达优化转染复数,Western blot 检测 HO-1 蛋白表达。设 HO-1 转染组(A 组)、空载体转染组(B 组)和未转染组(C 组);MTT,流式分析和茜素红钙结节染色分别检测各组增殖、凋亡和成骨分化情况。结果:分离获得的 ADSCs 具有多向分化潜能:CD29(+),CD44(+),CD90(+),CD31(-),CD45(-);经菌液 PCR 和 Western blot 鉴定 HO-1 基因重组慢病毒载体构建成功,与 B、C 组相比,A 组具有较高的细胞活性($P<0.05$),无血清培养基中较低的凋亡率($P<0.05$),并增加细胞钙化基质形成的量($P<0.05$)。结论:成功构建 HO-1 基因重组慢病毒表达载体并转染大鼠 ADSCs,HO-1 基因转染入 ADSCs 后表达 HO-1 蛋白成功,HO-1 转染后可以发挥对 ADSCs 促增殖、抗凋亡和促成骨分化的作用。

关键词 脂肪基质干细胞;血红素氧化酶 1;慢病毒载体;成骨分化

中图分类号 Q81

文献标志码 A

Effect of proliferation, apoptosis and osteogenic differentiation of ADSCs transduced with heme oxygenase-1

CHEN Xiao-peng¹, HU Yong-cheng², FANG Cheng¹, ZHANG Li-juan¹, ZHANG Rong-xin¹, HUANG Wen-jing¹

(1.Graduate School, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. Department of Bone and Soft Tissue Tumors, Tianjin Hospital, Tianjin 300211, China)

Abstract Objective: To investigate the proliferation, apoptosis and osteogenic differentiation effect of heme oxygenase-1 (HO-1) overexpression mediated by lentivirus on adipose-derived stromal cells (ADSCs). **Methods:** Fat tissue was harvested from inguinal area of 10-week-old SD rats, after which ADSCs were isolated and cultured. The morphology of third passages were observed, the multi-differentiation effect and surface markers were investigated to identify ADSCs. The lentivirus vector containing HO-1 gene was constructed through genetic recombination. ADSCs were transfected by lentivirus with polybrene (8 μ g/mL). The multiplicity of infection was optimized and HO-1 expression in ADSCs was tested by Western blot. Cells were divided into three groups: ADSCs transfected with Lenti-HO-1 (group A), ADSCs transfected with empty vector (group B) and ADSCs (C group). The proliferation, apoptosis and osteogenic differentiation effect were investigated by MTT assay, flow cytometry and alizarin red staining. **Results:** ADSCs had a multi-differentiation character, CD29(+), CD44(+), CD90(+), CD31(-), CD45(-). The lentivirus containing HO-1 was constructed successfully evidenced by bacteria PCR and Western blot. Compared with group B and C, cells of group A had a better viability ($P<0.05$), exhibited anti-apoptotic effect ($P<0.05$) and more osteogenic differentiation ($P<0.05$). **Conclusion:** The lentivirus vector containing HO-1 gene is successfully constructed, and HO-1 could express in ADSCs transfected with Lenti-HO-1. HO-1 expression could enhance pro-viability and anti-apoptotic effect, and it could stimulate osteogenic differentiation of ADSCs.

Key words adipose-derived stromal cells; heme oxygenase-1; lentivirus; osteogenic differentiation

骨组织工程为骨缺损修复提供了一种有效的方法,其中脂肪基质干细胞(adipose-derived stromal cells, ADSCs)因取材方便、易获得,具有多种定向分化潜能的特点成为骨组织工程良好的种子细胞^[1]。

近年来国内外学者对 ADSCs 成骨分化及其促进骨缺损修复等功能进行了大量研究。但单纯的 ADSCs 植入体内后细胞大量凋亡,且 ADSCs 较骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)有脂肪分化的潜能^[2]。血红素氧化酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)是血红素代谢的限速酶,因其可以通过一种或几种代谢产物发挥抗凋亡、抗炎等作用而受到重视^[3]。将 HO-1 基因修饰 ADSCs 有望克服以上不

基金项目 天津市自然科学基金资助项目(12JCYBJC16400),天津市卫生局科技基金资助项目(2011KY24)

作者简介 陈晓鹏(1987-),男,硕士在读,研究方向:骨损伤修复;通信作者:胡永成, E-mail: yongcheng.hu@yahoo.com。

足,更好地发挥血管新生和成骨分化的促进作用。因此,我们构建了携带 HO-1 基因的慢病毒,将其感染 ADSCs,长期传代,获得持续稳定表达,并对其生物学特性进行观察。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要试剂、仪器 10 周龄清洁雄性 SD 大鼠 8 只,体质量 200~300 g,购自中国人民解放军军事科学研究院。

FBS (HyClone 公司,美国);L-DMEM 培养基 (GIBCO 公司,美国);双抗 (青霉素-链霉素,GIBCO 公司,美国);聚凝胺 (polybrene),I 型胶原酶,抗坏血酸,地塞米松, β -甘油磷酸钠,甲基黄嘌呤 (IBMX),吡啶美辛 (Sigma 公司,美国);磷酸盐缓冲液 (PBS),茜素红 (生工,中国)。慢病毒载体 pZsG-GFP、包装质粒 packA、packB、packC,293T 细胞由天津医科大学免疫炎症实验室张荣信教授惠赠;质粒 pUC57-HO-1 由金唯智 (苏州,中国)合成,Plasmid 抽提试剂盒 (Qiagen 公司,德国),大鼠 HO-1 抗体 (Santa Cruz 生物公司,美国),CD29-PE,CD31-APC,CD44-PE,CD45-FITC,CD90-FITC (BD eBioscience,美国)。Plus-20 离心超滤装置 (Millipore 公司,美国);倒置荧光显微镜 (Olympus 公司,日本);Accuri C6 流式细胞仪 (BD,加拿大)。

1.2 大鼠 ADSCs 分离、培养及鉴定

1.2.1 大鼠 ADSCs 分离、培养 无菌条件下取脂肪组织置入无菌离心管中,PBS 冲洗 3 遍,剔除血管、筋膜组织后剪碎,0.1% I 型胶原酶 37℃震荡消化 1 h,等体积 DMEM/体积分数 10%的 FBS 中和,采用密度梯度离心法分离培养大鼠 ADSCs,1 000 r/min,离心 5 min,0.22 μ m 筛网过滤,1 000 r/min,离心 5 min,弃上清,DMEM 培养基重悬细胞,将细胞接种于培养瓶中,用 DMEM 培养基含 10%的 FBS 和 1%双抗培养。48 h 后换液,除去未贴壁的细胞。细胞生长至 80%~90%融合状态时,0.05%胰蛋白酶-0.02% EDTA 消化传代。取生长状态良好的第 3~5 代细胞用于后续实验。

1.2.2 大鼠 ADSCs 鉴定 倒置显微镜下观察 ADSCs 形态及其生长变化;在成骨 (DMEM,5%FBS,1%双抗,0.1 μ mol/L 地塞米松+50 μ mol/L 抗坏血酸+10 mmol/L β -甘油磷酸钠)和成脂 (DMEM,5%FBS,1%双抗,10 mg/L 胰岛素+1 μ mol/L 地塞米松、100 μ mol/L 吡啶美辛、500 μ mol/L 的甲基黄嘌呤)培养基上诱导 21 d 培养 ADSCs,每 3 d 换液,观察其多分化潜能;流式细胞仪分析 ADSCs 表面 CD29、

CD44、CD90、CD31、CD45 分子的表达。

1.3 HO-1 慢病毒表达载体构建及 HO-1 慢病毒获取

1.3.1 PCR 法获得 HO-1 基因片段 从 Genbank 中提取大鼠 HO-1 基因 (NM_012580) 编码区序列,根据慢病毒表达载体 pZsG 酶切位点要求,由金维智公司将 HO-1 基因合成在质粒 pUC57-HO-1 中。将 pUC57-HO-1 和 pZsG 分别进行 *Not* I 和 *Bam*HI 双酶切,1%琼脂糖凝胶电泳检测,目的条带以胶回收试剂盒回收。

1.3.2 HO-1 基因片段与慢病毒载体 pZsG 重组 切胶回收产物定向连接经大肠杆菌转化,对长出的克隆进行 PCR 鉴定,共挑选 5 个克隆。引物序列:上游引物 5'-ATGGAGCGCCACAGCTCG-3',下游引物 5'-ACTGCCACGGTCGCCAACAG-3',其中 PCR 鉴定为阳性的克隆,证明 HO-1 已经定向连入 pZsG,命名为 pZsG-HO-1。

1.3.3 慢病毒载体大量抽提 按照 Plasmid 抽提试剂盒操作手册步骤分别抽提慢病毒载体质粒:pZsG-GFP、pZsG-HO-1、packA、packB 和 packC。保证所提质粒 DNA 的吸光度 (A260/A200) 值为 1.8~2.0,-20℃保存。

1.3.4 慢病毒包装 取生长状态良好的 293T 细胞,包装前按细胞密度 1×10^5 /mL 接种于含完全培养基的 10 cm 培养皿中,待细胞融合率约 70%时,开始包装。包装前 1 h 更换无血清培养基,将上述表达质粒与包装质粒按 1:3:1:1 的质量比混合,再添加 3 倍体积的 PEI,混匀后 37℃孵育 20 min,分别加入满足包装要求的 293T 细胞中。48 h 和 72 h 后收集病毒上清,-80℃保存备用。

1.4 HO-1 重组慢病毒载体转染 ADSCs 取第 3 代大鼠 ADSCs,待细胞生长达 70%~80%融合后弃上清,加入 10 mL 的慢病毒液和 8 μ g/mL 的聚凝胺 (polybrene),置于 37℃、5% CO₂ 及饱和湿度孵育箱中孵育,6 h 后全量换液,更换完全培养基,转染 24、48、72 h 后根据空载体表达绿色荧光的特点,采用倒置荧光显微镜观察不同感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 10、15、20、30、50、100 下慢病毒的感染效率,选择荧光表达效率最高、细胞生长状态最佳的 MOI 值作为最佳 MOI 值进行后续实验。Western blot 验证 HO-1 重组慢病毒载体转染 ADSCs 后表达情况。

1.5 观测指标

1.5.1 MTT 法检测转染后 ADSCs 生长情况 根据处理方法不同分为 3 组:A 组 (HO-1 基因重组慢病毒载体转染 ADSCs)、B 组 (pZsG-GFP 慢病毒载体

转染 ADSCs)、C 组(未转染 ADSCs),每组设 3 个复孔。取生长状态良好不同组的第 3 代 ADSCs,经消化离心重悬细胞后计数,按细胞密度 1×10^3 个/孔接种于 96 孔板中,于 37°C 、5% CO_2 及饱和湿度孵育箱中培养,隔天换液 1 次。分别于转染后 1、2、3、4、5、6、7 d 进行 MTT 检测,在酶联免疫仪上 490 nm 下测定吸光度值(OD)。

1.5.2 流式细胞仪分析 HO-1 高表达对 ADSCs 抗凋亡的影响 实验分组同 1.5.1。按细胞密度 1×10^5 个/孔接种于 6 孔板中,当细胞贴壁后更换无血清培养基,培养 3 d 后收集各组细胞。根据凋亡试剂盒(三箭,天津)要求进行染色,C6 流式分析仪分析各组细胞凋亡情况。

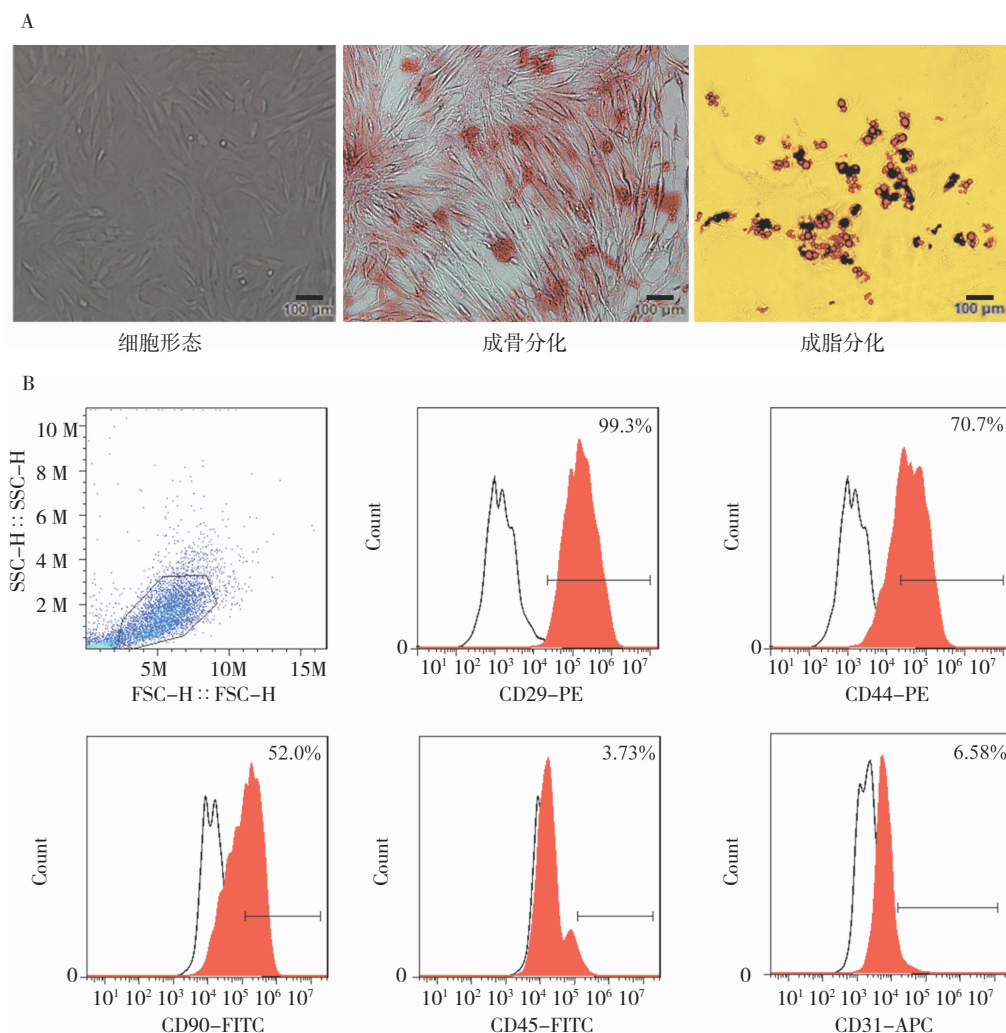
1.5.3 转染后 ADSCs 成骨分化观察 实验分组同 1.5.1。茜素红染色:将 3 组细胞按细胞密度 5×10^4 个/孔接种于 6 孔板中,成骨培养基中培养 3 周后,PBS 冲洗 3 次,每次 5 min,无水甲醇固定 10 min

后,双蒸水冲洗 3 次,每次 5 min,加入 pH 7.4 的 1% 茜素红染液,于 37°C 恒温箱中孵育 40 min,双蒸水冲洗 3 次,倒置相差显微镜下观察钙结节形成情况。

2 结果

2.1 大鼠 ADSCs 形态学观察及鉴定 原代细胞培养 48 h 后,倒置显微镜下可见细胞呈长梭形贴壁生长;成骨诱导 3 周后茜素红染色可见多数细胞胞质中有红色颗粒或大片红色沉淀。成脂诱导 3 周后油红 O 染色可见细胞内有红色脂滴。流式细胞仪检测示细胞表面标志物 CD29(+)、CD44(+)、CD90(+)、CD31(-)、CD45(-)(图 1)。

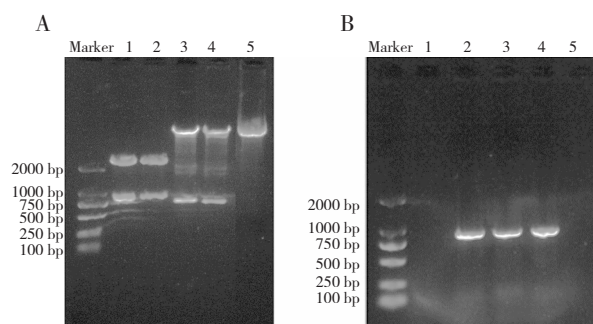
2.2 含 HO-1 的慢病毒表达载体构建 HO-1 基因片段经限制性内切酶 *Not* I 和 *Bam* H I 酶切后可获得长度为 869 bp 的片段产物(图 2A)。随机挑选 5 个单克隆菌落行 PCR 鉴定,其中 2、3、4 为阳性,片段大小约为 900 bp(图 2B)。与 Genbank 中的参考序列一致,提示成功构建 HO-1 基因慢病毒载体。



A:ADSCs 形态,成骨和成脂分化;B:流式鉴定 ADSCs 表面标记物

图 1 ADSCs 形态学、多向分化潜能及表面标记物鉴定

Fig 1 Identification of ADSCs from morphology, multi-differentiation and surface marker



ApUC57-HO-1 和 pZsG-GFP 分别进行双酶切。1、2 为 pUC-57-HO-1 双酶切片断;3、4 为 pZsG-GFP 双酶切片断;5 为未经酶切的 pZsG-GFP BpZsG-HO-1 菌液 PCR。2、3、4 为阳性克隆,1、5 为阴性克隆

图2 慢病毒表达载体 pZsG-HO-1 的构建

Fig2 Construction of lentiviral pZsG-HO-1 plasmid

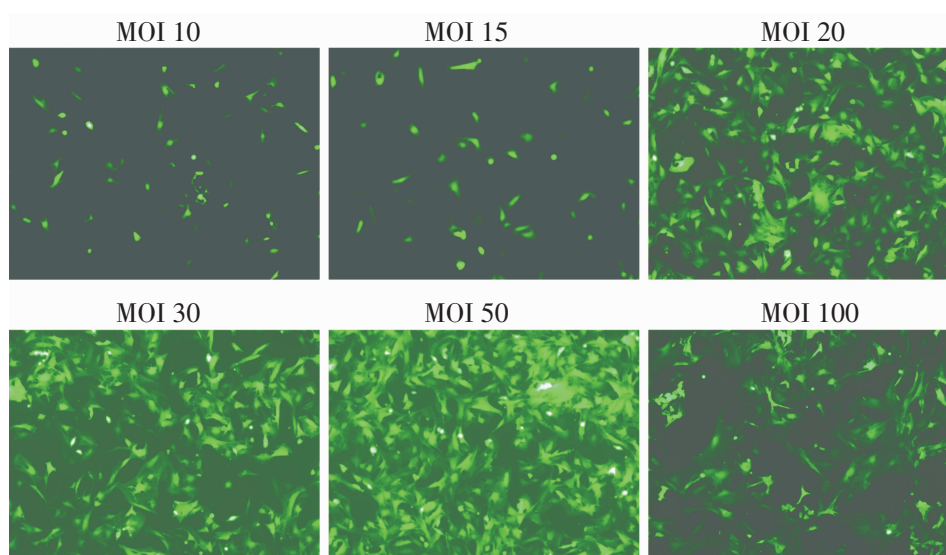


图3 不同梯度慢病毒 MOI 转染 ADSCs 后荧光表达

Fig3 The fluorescence of ADSCs transfected with the gradient MOI of lentivirus

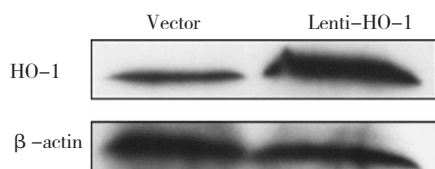


图4 Western blot 检测慢病毒介导 HO-1 转染 ADSCs

Fig4 HO-1 expression in ADSCs mediated by lentivirus and evidenced by Western blot

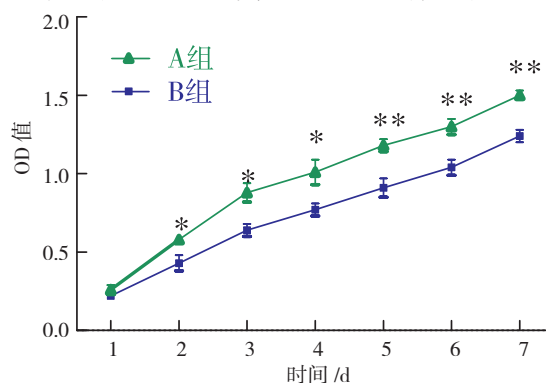
2.4 MTT 法检测转染后 ADSCs 活性 MTT 法显示:转染后 2 d 开始,A 组细胞生长良好,OD 值比较有统计学意义($P<0.05$);而空载体组和未转染组细胞生长无明显变化,OD 比较差异无统计学意义。随着培养时间延长,各组细胞生长呈上升趋势,其中 A 组 OD 值显著优于 B 组,差异有统计学意义($P<0.05$)(图 5)。

2.5 流式细胞技术分析转染后 ADSCs 凋亡 流式

2.3 重组慢病毒的感染效率及目的基因的表达

慢病毒感染 ADSCs 96 h 后,荧光倒置显微镜下观察绿色荧光,结果显示:当 MOI 值为 10、15 时可见不足 50% 荧光表达;当 MOI 值为 20 时,可见大部分(90%)ADSCs 表达绿色荧光。当 MOI 值为 30 时并不能有效增加荧光表达,且随着 MOI 值的增加,细胞生长状态较差,出现漂浮细胞,提示对大鼠 ADSCs 而言,MOI 为 20 时为慢病毒的最佳感染复数,慢病毒感染 ADSCs 细胞达到 90% 以上的感染效率,符合基因治疗对载体的要求(图 3)。Western blot 结果表明,实验组 HO-1 蛋白水平显著高于空载体组($P<0.05$),差异有统计学意义(图 4)。

细胞仪检测结果(表 1)表明,A 组细胞凋亡率较 B 组和 C 组明显减少,差异具有统计学意义($P<0.05$);而 B 组与 C 组之间比较差异无统计学意义,表明 HO-1 重组基因高表达可以降低 ADSCs 在无血清条件下的凋亡率,对细胞发挥保护效应。



* $P<0.05$, ** $P<0.01$

图5 MTT 检测不同转染组 ADSCs 的细胞活性

Fig5 ADSCs viability of ADSCs in different transfection groups measured by MTT

表 1 不同转染组在无血清培养基下的凋亡率(%)

Tab 1 The apoptosis rate of ADSCs in different groups in the medium without serum (%)

分组	早期凋亡	晚期凋亡	总凋亡
A 组	20.70±3.01	20.60±1.93	41.30±3.34
B 组	31.87±3.15	26.90±4.29	58.77±4.24
C 组	28.67±2.43	26.67±5.42	55.33±4.50

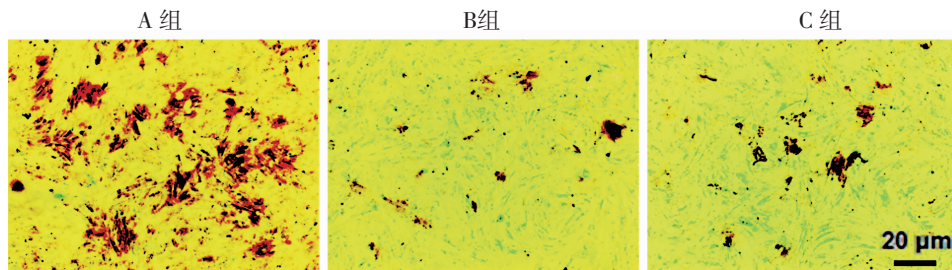


图 6 茜素红染色分析不同转染组钙基质形成情况

Fig 6 Calcium deposition of different groups stained by alizarin red

3 讨论

ADSCs 具有多向分化潜能,为组织工程骨构建增加了细胞成分,是目前骨组织工程的研究热点,本研究中成功分离提取了 ADSCs^[1]。骨缺损局部微环境常面临低氧、氧化应激的损伤,不利于细胞存活,使得植入体内的细胞早期凋亡率增加,1~2 周内细胞在支架上逐渐消失,4 周后全部消失^[4]。ADSCs 联合支架植入体内达不到骨修复的效果^[5]。同时植入体内的种子细胞缺乏有效的刺激使其达到骨修复的目的。近年来,在心血管领域广泛应用的 HO-1 通过代谢血红素产生 CO、胆绿素、二价铁离子,可以发挥抗炎、抗凋亡等细胞保护作用,将其引入骨组织工程可能利于骨修复^[6]。

与蛋白为基础的治疗相比,携带基因成本低、效率高,1996 年第一次尝试基因治疗应用于骨组织工程以来,基因治疗在骨组织工程中得到了广泛地研究^[7]。为了更好地将目的基因与靶细胞整合,达到基因治疗的目的,基因载体的选择尤为关键。慢病毒载体能够携带目的基因与靶细胞基因组整合,使得目的基因能够长期稳定表达,且具有不易诱导宿主免疫反应等优点^[8]。更重要的是,慢病毒载体可转染分裂细胞及非分裂细胞,携带基因片段容量较大^[9]。因此,我们研究中选择慢病毒表达载体作为目的基因的携带工具。

本实验将通过 *Not I* 和 *BamH I* 酶切获得的大鼠 HO-1 基因片段与经相同酶切的慢病毒表达载体 pZsG 连接后转化入 *E.coli* DH5 α 感受态细胞,并通过酶切电泳分析仪和设计特异性引物进行菌液

2.6 茜素红钙基质染色 转染后 3 周,A 组可见较多细胞出现大量片状融合褐色矿化结节(图 6);Image J 软件分析显示,A 组矿化结节形成区域较 B 组和 C 组明显增多,差别有统计学意义($P<0.05$);而 B 组及 C 组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。

PCR 对重组 DNA 进行鉴定,结果与 GenBank 中序列大体一致,初步验证构建的重组质粒目的基因片段为小鼠 HO-1 基因。此外,Western blot 证明 HO-1 基因已经成功转染 ADSCs 并出现蛋白水平表达,表明慢病毒介导 HO-1 成功导入 ADSCs 中,建立 HO-1/ADSCs 模型。

骨生成过程涉及细胞增殖、细胞趋化、基质合成和成骨分化^[10]。细胞活性是细胞发挥功能的关键,该实验证实转染 HO-1 基因后可维持较高的细胞活性,与 HO-1 在内皮细胞发挥的作用一致^[3],而血管平滑肌细胞中高水平的 HO-1 可以抑制细胞增殖^[11],HO-1 这种细胞选择性更有利于血管新生,但其作用机制仍不清楚,需要进一步研究。另外,HO-1 在内皮细胞中还具有抗凋亡的特性,将其作为生长因子引入骨组织工程的种子细胞可能更有利。在四肢骨缺损常面临缺血微环境,造成植入体内的 ADSCs 处于营养物质不足、低氧等应激状态^[12],该实验通过体外采用无血清条件来模拟体内环境,证实 HO-1 转染组具有相对较低的细胞凋亡率,与之前很多关于保护心肌免受缺血再灌注损伤的研究一致^[13]。良好的细胞活性和无血清状态下的抗凋亡效应,二者相辅相成共同保证参与骨生成的细胞数量。同时,该研究中还证实转染 HO-1 组可以促进矿化基质的合成,提示 HO-1 具有直接的促成骨效应^[3,14]。有趣的是,Zwerina 等^[15]研究发现 HO-1 可以调节破骨细胞生成和骨吸收,提示 HO-1 也可以参与骨重建过程,可能在骨修复的不同阶段发挥不同的效应。

综上,HO-1 在 ADSCs 可以发挥促增殖、抗凋

亡的特性,同时,在适当的诱导环境下可以促进成骨分化,慢病毒介导 HO-1 转染 ADSCs 有望作为种子细胞应用于骨组织工程。

参考文献:

- [1] Zuk P. Adipose-derived stem cells in tissue regeneration: a review [J]. *ISRN Stem Cells*, 2013, DOI:10.1155/2013/713959
- [2] Lotfy A, Salama M, Zahran F, et al. Characterization of mesenchymal stem cells derived from rat bone marrow and adipose tissue: a comparative study[J]. *Int J Stem Cells*, 2014, 7(2): 135
- [3] Kim Y M, Pae H O, Park J E, et al. Heme oxygenase in the regulation of vascular biology: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 14(1): 137
- [4] Gambin A L, Brennan M A, Renaud A, et al. Bone tissue formation with human mesenchymal stem cells and biphasic Calcium phosphate ceramics: the local implication of osteoclasts and macrophages[J]. *Biomaterials*, 2014, 35(36): 9660
- [5] Shi J J, Zhang X, Zhu J X, et al. Nanoparticle delivery of the bone morphogenetic protein 4 gene to adipose-derived stem cells promotes articular cartilage repair in vitro and in vivo [J]. *Arthroscopy*, 2013, 29(12): 2001
- [6] 陈晓鹏,胡永成,方成,等. 血红素氧化酶 1 在骨组织工程中的应用分析研究进展 [J]. *中国修复重建外科杂志*, 2013, 27(10): 1256
- [7] Kimelman Bleich N, Kallai I, Lieberman J R, et al. Gene therapy approaches to regenerating bone [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2012, 64(12): 1320
- [8] Varma N, Janic B, Ali M, et al. Lentiviral based gene transduction and promoter studies in human hematopoietic stem cells (hHSCs)[J]. *J Stem Cells Regen Med*, 2011, 7(1): 41
- [9] Ngai S C, Rosli R, Nordin N, et al. Lentivirus vector driven by polybiquitin C promoter without woodchuck posttranscriptional regulatory element and central polypurine tract generates low level and short-lived reporter gene expression[J]. *Gene*, 2012, 498(2): 231
- [10] Gurkan U A, Gargac J, Akkus O. The sequential production profiles of growth factors and their relations to bone volume in ossifying bone marrow explants[J]. *Tissue Eng Part A*, 2010, 16(7): 2295
- [11] Li Volti G, Wang J S, Traganos F, et al. Differential effect of heme oxygenase -1 in endothelial and smooth muscle cell cycle progression[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 296(5): 1077
- [12] Wagers A J. The stem cell niche in regenerative medicine[J]. *Cell Stem Cell*, 2012, 10(4): 362
- [13] Yang J J, Yang X, Liu Z Q, et al. Transplantation of adipose tissue-derived stem cells overexpressing heme oxygenase -1 improves functions and remodeling of infarcted myocardium in rabbits [J]. *Tohoku J Exp Med*, 2012, 226(3): 231
- [14] Vanella L, Kim D H, Asprinio D, et al. HO-1 expression increases mesenchymal stem cell-derived osteoblasts but decreases adipocyte lineage[J]. *Bone*, 2010, 46(1): 236
- [15] Zwerina J, Tzima S, Hayer S, et al. Heme oxygenase 1 (HO-1) regulates osteoclastogenesis and bone resorption[J]. *FASEB J*, 2005, 19(14): 2011

(2015-03-03 收稿)

(上接第 378 页)

研究表达的 FGF1 蛋白是否具有功能尚待进一步深入论证,但该方法的表达成功以及 mRNA 自身所具有的特质,为 FGF1 治疗糖尿病以及其他疾病的基因治疗提供了一种新的途径,为找到 FGF1 调节血糖作用的信号路径和受体提供了一定的实验基础。

参考文献:

- [1] Itoh N, Ornitz D M. Fibroblast growth factors: from molecular evolution to roles in development, metabolism and disease[J]. *J Biochem*, 2011, 149(2):121
- [2] Jonker J W, Suh J M, Atkins A R, et al. A PPAR γ -FGF1 axis is required for adaptive adipose remodelling and metabolic homeostasis [J]. *Nature*, 2012, 485(7398):391
- [3] Suh J M, Jonker J W, Ahmadian M, et al. Endocrinization of FGF1 produces a neomorphic and potent insulin sensitizer[J]. *Nature*, 2014, 513(7518):436
- [4] Petsch B, Schnee M, Vogel A B, et al. Protective efficacy of in vitro synthesized, specific mRNA vaccines against influenza A virus infection[J]. *Nat Biotechnol*, 2012, 30(12):1210
- [5] Hoerr I, Obst R, Rammensee H G, et al. In vivo application of RNA leads to induction of specific cytotoxic T lymphocytes and antibodies [J]. *Eur J Immunol*, 2000, 30(1):1
- [6] Rabinovich P M, Komarovskaya M E, Ye Z J, et al. Synthetic messenger RNA as a tool for gene therapy[J]. *Hum Gene Ther*, 2006, 17(10):1027
- [7] Kramps T, Probst J. Messenger RNA-based vaccines: progress, challenges, applications[J]. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2013, 4(6):737
- [8] Pasquinelli A E, Dahlberg J E, Lund E. Reverse 5' caps in RNAs made in vitro by phage RNA polymerases[J]. *RNA*, 1995, 1(9):957
- [9] Grudzien E, Kalek M, Jemielity J, et al. Differential inhibition of mRNA degradation pathways by novel cap analogs[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(4):1857
- [10] Wiederhold K, Passmore L A. Cytoplasmic deadenylation: regulation of mRNA fate[J]. *Biochem Soc Trans*, 2010, 38(6):1531
- [11] Amrani N, Ghosh S, Mangus D A, et al. Translation factors promote the formation of two states of the closed-loop mRNP[J]. *Nature*, 2008, 453(7199):1276
- [12] Malone R W, Felgner P L, Verma I M. Cationic liposome-mediated RNA transfection[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989, 86(16):6077
- [13] Wang Z, Day N, Trifillis P, et al. An mRNA stability complex functions with poly (A)-binding protein to stabilize mRNA in vitro[J]. *Mol Cell Biol*, 1999, 19(7):4552
- [14] Peixeiro I, Silva A L, Romão L. Control of human beta-globin mRNA stability and its impact on beta-thalassemia phenotype[J]. *Haematologica*, 2011, 96(6):905
- [15] Kallen K J, Thess A. A development that May evolve into a revolution in medicine: mRNA as the basis for novel, nucleotide-based vaccines and drugs[J]. *Ther adv vaccines*, 2014, 2(1):10
- [16] Pascolo S. Vaccination with messenger RNA(mRNA)[J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2008(183):221
- [17] Rettig L, Haen S P, Bittermann A G, et al. Particle size and activation threshold: a new dimension of danger signaling[J]. *Blood*, 2010, 115(22):4533
- [18] Karikó K, Muramatsu H, Ludwig J, et al. Generating the optimal mRNA for therapy: HPLC purification eliminates immune activation and improves translation of nucleoside-modified, protein-encoding mRNA[J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(21):e142

(2015-03-17)