

文章编号 1006-8147(2015)05-0375-04

论 著

## 体外构建合成成纤维细胞生长因子-1 mRNA 及其表达的初步研究

吴志敏,李光明,白 洁,王金鑫,贾欣雨,杜晓玲,朱 泽  
(天津医科大学病原生物学教研室,天津 300070)

**摘要** 目的:参照 mRNA 稳定性理论,设计并体外转录合成具有一定稳定性的 FGF1 mRNA,对其表达进行初步验证。方法:在 pT7TS 载体上加 poly A、 $\beta$  globin 3'、5' UTR,增加 GC 含量优化设计 FGF1 序列,并结合 mRNA 二级结构分析其稳定性,目的序列琼脂糖凝胶电泳及测序验证后,体外转录合成 FGF1 mRNA,待浓度及片段大小验证后,行动物实验,通过 ELISA 法检测 FGF1 mRNA 表达。结果:二级结构分析显示,优化后 FGF1 序列稳定性更高;双酶切后琼脂糖凝胶电泳显示 pT7TS-FGF1 重组载体构建成功,测序验证正确;聚丙烯酰胺凝胶电泳显示合成 mRNA 大小正确。ELISA 检测显示,实验组(92.48 pg/mL)小鼠血清中 FGF1 蛋白含量较对照组(13.59 pg/mL 和 15.54 pg/mL)明显升高,差异有统计学意义( $P<0.01$ );对照组间 FGF1 蛋白含量接近,二者无统计学差别( $P>0.05$ )。结论:成功构建并体外转录合成稳定的 FGF1 mRNA,mRNA 与鱼精蛋白结合后回输小鼠在体内成功表达。

**关键词** 体外转录;mRNA 稳定性;成纤维细胞生长因子-1;体内表达

中图分类号 Q7

文献标志码 A

### Preliminary study on the construction, the synthesis of FGF-1 mRNA *in vitro* and its expression *in vivo*

WU Zhi-min, LI Guang-ming, BAI Jie, WANG Jin-xin, JIA Xin-yu, DU Xiao-ling, ZHU Ze

(Department of Microbiology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

**Abstract** **Objective:** To optimize and synthesize FGF-1 mRNA by *in vitro* transcription and investigate its stability and expression both *in vitro* and *in vivo*. **Methods:** Poly A and  $\beta$  globin 3' and 5' UTR on pT7TS were added. FGF1 sequence were optimized by increasing GC content and analyzing its stability with the secondary structure of mRNA. Constructed pT7TS-FGF1 then verified it correction by agarose gel electrophoresis (AGE) and sequencing. After the *in vitro* transcription FGF1 mRNA, its concentration was measured by Nardrop and its size was analysed by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). The expression of mRNA *in vivo* was detected by ELISA in mice assay. **Results:** The optimized FGF1 was more stable after being predicted and analyzed by secondary structure. Double digestion verification of agarose gel electrophoresis and the sequencing showed that pT7TS-FGF1 had been constructed successfully. The band on PAGE verified that the mRNA size was correct. ELISA assay result showed the expression of the FGF1 protein in serum in the test group (92.48 pg/mL) was higher than that of the control group (13.59 pg/mL and 15.54 pg/mL) ( $P<0.01$ ). No significant difference was found in the expression of the FGF1 protein in serum between the control groups ( $P>0.05$ ). **Conclusion:** FGF1 mRNA can be successfully constructed and synthesized by *in vitro* transcription. mRNA bounding with protamine can be expressed in the injected mice.

**Key words** *in vitro* transcription;mRNA stability;FGF1;*in vivo* expression

成纤维细胞生长因子-1 (fibroblast growth factor-1, FGF1) 是一种细胞因子,具有促有丝分裂作用<sup>[1]</sup>,研究发现其有潜在的调节营养平衡作用<sup>[2]</sup>。2014 年,美国科学家通过动物实验证实<sup>[3]</sup>,糖尿病小鼠单次注射 FGF1 蛋白,可持续 2 d 以上将血糖水平恢复至正常范围。与普通胰岛素增敏药相比,FGF1 蛋白不会引起小鼠体质量增加、心脏和肝脏

危险性等问题副作用。但 FGF1 克隆蛋白是由拟核细菌表达的异源性蛋白,免疫原性和安全性问题限制了其广泛应用。而近来发展的 mRNA 体外合成技术,能够很好地解决这一问题。2012 年 Petsch 等<sup>[4]</sup>体外转录合成稳定性 mRNA 的抗流感疫苗,并在小鼠体内成功表达出蛋白即抗体,抵抗流感病毒的感染。本研究通过优化设计并体外转录合成稳定的 FGF1 mRNA,与鱼精蛋白结合成体外稳定结构,小鼠皮下注射,观察其在小鼠体内的表达蛋白,为体外合成 mRNA 技术构建的细胞因子预防和治疗疾病,进一步为 FGF1 细胞因子治疗糖尿病奠定基础。

基金项目 国家自然科学基金资助项目(81402215);天津医科大学基金资助项目(2013KYQ13)

作者简介 吴志敏(1990-),男,硕士在读,研究方向:转录机制及疾病的生物治疗;通信作者:朱泽, E-mail: zhuze@tmu.edu.cn。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 主要试剂 质粒提取试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒购自天根生化科技有限公司,聚丙烯酰胺凝胶 RNA 回收试剂盒(Poly-Gel RNA Extraction Kit)购自 Omega 公司,体外转录试剂盒(mMESSAGE mMACHINE Kit)购自 Ambion 公司,Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶 *Spe* I、*Sal* I 和 *Eco*R I、T4 DNA 连接酶、RNA marker 购自大连宝生物工程有限公司。Trans2K Plus II DNA Marker、DH5 $\alpha$  感受态、PCR 混合试剂购于北京全式金生物技术有限公司,引物合成及测序于苏州金唯智生物科技有限公司。鱼精蛋白购自 Sigma 公司,人酸性成纤维细胞生长因子(FGF1)ELISA 试剂盒为美国 Rapidbio 产品。

1.1.2 仪器设备 涡旋振荡器(Vortex-genie 2)、高速冷冻离心机(Eppendorf 5415R centrifuge)、Nanodrop (ND-1000 型)、PCR 仪(Eppendorf 22331 Hamburg)、Real-time PCR 仪(BIO-RAD iQ5)、电泳仪(北京六一仪器厂 DYY-7C 型)、凝胶成像系统(BIO-RAD ChemiDoc™ XRS)、超低温冰箱(海尔 DW-86L388)、电子天平(Sartorius CPA64)。

1.2 质粒和动物 pT7TS 购自 Addgene 官网,雄性 ICR 小鼠(18~20 g)30 只,购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

### 1.3 方法

1.3.1 pT7TS 载体优化 pT7TS 送金唯智公司测序确定。载体 T7 启动子之后,设计加入序列,分别为 globin 5' UTR、酶切位点、globin 3' UTR、poly A 结构 A60。由苏州金唯智公司合成并测序验证。

1.3.2 FGF1 序列合成及目的载体构建 FGF1 目的序列参照 GeneBank NM\_001257210.1,结合软件二级结构预测,在不改变编码氨基酸的情况下进行种属偏好密码子优化,调整 GC 含量并做分析。选择其中 GC 含量高且稳定性及结构合理的序列,经序列碱基分析后两端分别设计酶切位点为 *Spe* I 和 *Sal* I,由苏州金唯智公司合成。前期优化的质粒 pT7TS 和目的序列 FGF1 在 37 °C 水浴条件下同时进行 *Spe* I 和 *Sal* I 双酶切 2 h,1%琼脂糖凝胶电泳 72 V 25 min 后用 DNA 回收试剂盒回收,使用 T4 DNA 连接酶将目的片段与载体片段于 PCR 仪中 16 °C 连接过夜。

1.3.3 克隆菌的转化及鉴定 连接产物转化于大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞中,接种于氨苄抗性的 LB 平板上,37 °C 培养箱中过夜。16~18 h 内从 LB 平板上挑选多个单克隆菌,依次接种于 5 mL LB 液体培

养基(氨苄抗性)的试管中,放置于摇床,37 °C,200 r/min 摇菌 1 h。后每管取 1  $\mu$ L 菌液行菌落 PCR,引物为 Forward:GGCAGATCTGTCTGACCTCGAGACT-AGTATGGCTGAAGGGGAAATCACCACC,Reverse:AACCAGATCCTAGTCAGTCGATATCTTAATCAGA-AGAGACTGG CAGGGGG。条件:95 °C 3 min;95 °C 30 s,50 °C 1 min,68 °C 1 min,35 REP;68 °C 4 min;HOLD 4 °C。琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 扩增产物,筛选阳性单克隆菌继续培养 16~20 h,按说明书抽提质粒。提取的质粒以 *Spe* I 和 *Sal* I 双酶切(37 °C 水浴,4 h),琼脂糖凝胶电泳鉴定。鉴定阳性的重组质粒用 Nanodrop 测定浓度,并送苏州金唯智生物科技有限公司测序,与理论序列比对。

1.3.4 FGF1 mRNA 体外合成 在无菌无 RNA 酶条件下,按照 mMESSAGE mMACHINE 体外转录操作步骤,将鉴定阳性的重组质粒用 *Eco*R I 单酶切线性化(37 °C,2 h),加入 EDTA 醋酸铵混合液和无水乙醇停止反应,-20 °C 放置 15 min。微型离心机以最大转数(13.2 $\times$ 1 000 r/min)离心 15 min,去上清,枪头小心地移去残余液体。按照重组质粒浓度计算,用无酶水重悬线性质粒浓度为 0.5~1  $\mu$ g/ $\mu$ L。室温下将转录反应组分混合,1  $\mu$ L 线性质粒于 20  $\mu$ L 体系,37 °C 2 h。加入 TURBO DNase 1  $\mu$ L 反应 37 °C 15 min,降解模板 DNA。后加入 50  $\mu$ L LiCl 溶液沉淀 RNA,充分混匀,-20 °C 冷却 $\geq$ 30 min,以最大转速(13.2 $\times$ 1 000 r/min)4 °C 15 min 离心。小心吸除上清,用 1 mL 70%乙醇冲洗 1 次,再次以同样条件离心。小心吸除 70%乙醇,无 RNA 酶水溶解后测定 RNA 浓度,-70 °C 保存。过程中所有溶液均为试剂盒自带或用无 RNA 酶水配制。

1.3.5 体外合成 mRNA 的鉴定 获得 mRNA 通过聚丙烯酰胺凝胶电泳验证后,使用聚丙烯酰胺凝胶 RNA 回收试剂盒进一步纯化回收,获得更纯的 FGF1 mRNA,并由 Nanodrop 测定浓度。后续实验用到的 mRNA 均由前面方法重复操作获得。

1.3.6 mRNA-鱼精蛋白复合物获得 按照参考文献[5]的方法,换算 mRNA 浓度后,在无菌无 RNA 酶室温条件下,将 0.5  $\mu$ g 鱼精蛋白:1  $\mu$ g mRNA(1:2)于 100  $\mu$ L 的缓冲液(150 mmol/L NaCl,10 mmol/L Hepes,pH7.4)中混合孵育,摇匀 5 min。不加 mRNA 的鱼精蛋白按同样步骤进行,用于下一步注射小鼠时的对照。所有用到的溶液均由无 RNA 酶水配制,操作迅速,摇匀后立即置于冰上。

1.3.7 FGF1 mRNA-鱼精蛋白在小鼠体内的表达 小鼠适应性饲养 1 周后,随机分为 3 组,每组 10

只,分别为1组:生理盐水对照组(0.1 mL/10 g);2组:空白鱼精蛋白对照组(0.1 mL/10 g);3组:FGF1 mRNA-鱼精蛋白组(0.1 mL/10 g)。每天定时注射1次,连续注射3 d,第4天通过尾静脉取血。用干净的1.5 mL离心管收集血液,室温放置2 h使血清析出,4 ℃ 3 000 r/min离心10 min,小心吸取上清。按照ELISA检测试剂盒说明步骤操作:设置标准品孔、样本孔和空白孔。标准品依次稀释为:1 000、500、250、125、62.5、0 pg/mL。标准品孔各加不同浓度的标准品50  $\mu$ L;待测样本孔加待测样本10  $\mu$ L和样本稀释液40  $\mu$ L。随后标准品孔和样本孔加HRP标记的检测抗体50  $\mu$ L,封板膜封住反应孔,37 ℃水浴锅温育60 min。弃去液体,吸水纸上拍干,每孔加满洗涤液,静置1 min后甩去洗涤液,吸水纸上拍干,重复洗板5次。所有孔加入底物A、B各50  $\mu$ L,37 ℃避光孵育15 min,再加入终止液50  $\mu$ L,15 min内酶标仪测定各孔450 nm处OD值。建立标准曲线,计算各孔FGF1蛋白含量。

## 2 结果

**2.1 优化后载体 pT7TS 序列** 根据 mRNA 稳定性理论及参考文献(讨论部分),优化设计后由公司合成并测序验证,得到了目的 pT7TS 序列,如图1。得到的质粒由 T7 作为启动子,能够在序列末端单酶切线性化,满足后续的实验要求。

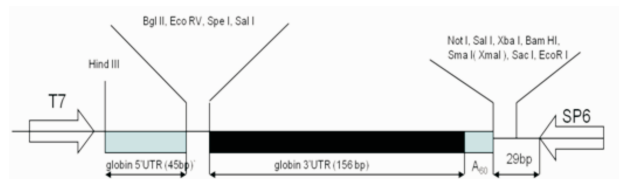


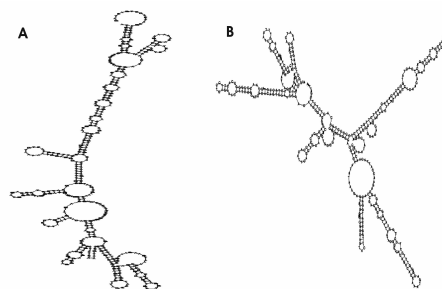
图1 优化 pT7TS 结构图

Fig 1 The optimized structure of pT7TS

**2.2 FGF1 序列的设计** 在保证编码氨基酸不变的前提下,进行种属密码子偏好优化,并适当调整增加目的序列中 GC 含量,由公司结合二级结构预测软件进行分析。如图2,序列 A 为优化之后,GC 含量为 58.97%,序列 B 为原始野生型序列,GC 含量为 51.50%。分析二级结构后初步认为,序列 A 的折叠和环相对较少,会比较稳定一些。

**2.3 pT7TS-FGF1 重组载体构建** 合成 FGF1 与优化 pT7TS 连接,经氨苄青霉素选择和菌落 PCR 鉴定阳性的菌液所提重组载体,经 *Spe* I 和 *Sal* I 双酶切验证,如图3。10个单克隆菌液 PCR,其中有8个得到的主条带均在 500 bp 附近,与 FGF1 PCR 条带大小相符。选取其中1个扩增抽提得到的重组质粒,未酶切的显示有4条条带,符合质粒电泳结果,其

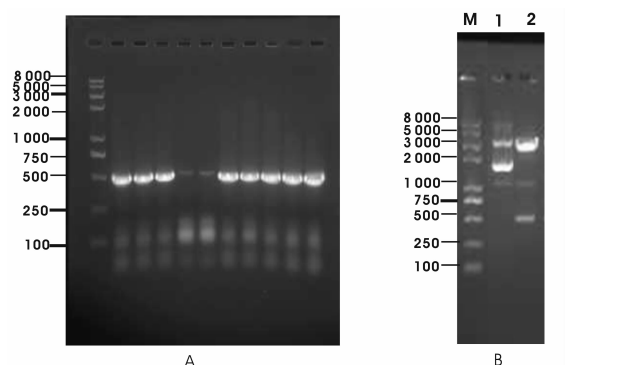
中较大的1条在3 000~4 000 bp 之间。双酶切后得到的2条条带分别约3 000 bp 和 500 bp,与优化 pT7TS 和 FGF1 的大小一致,初步说明重组载体构建成功。送公司测序,结果正确。



A: GC stabilized RNA sequence B: wildtype RNA sequence

图2 调整碱基后编码 FGF1 蛋白的 mRNA 结构

Fig 2 The secondary structure of optimized mRNA coding FGF1

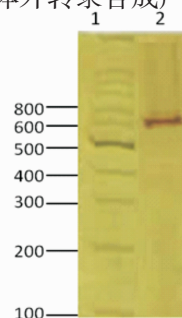


A: Colony PCR of pT7TS-FGF1 ; B: pT7TS-FGF1 ; M :Trans2K Plus II DNA Marker ; 1 .the undigested T7TS-FGF1 plasmid ; 2 .the T7TS-FGF1 plasmid were digested by *Spe* I and *Sal* I mix

图3 pT7TS-FGF1 琼脂糖凝胶电泳

Fig 3 Agarose gel electrophoresis of pT7TS-FGF1

**2.4 体外合成 mRNA 的检测** 图4结果显示,转录产物条带大小在 700 nt 附近,且条带单一。真核 mRNA 的结构中包括 5' cap、5' UTR、编码区、3' UTR 和 poly A 尾(图5),合成产物的条带位置符合理论合成 FGF1 mRNA 的大小。Narnodrop 测得 20  $\mu$ L 转录体系中,得到 mRNA 的量约为 15  $\mu$ g,OD<sub>260/280</sub> 约 1.9~2.0。每次体外转录合成产物略有差别。



1.500 nt RNA marker 2. Synthetic FGF1 mRNA

图4 mRNA 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测结果

Fig 4 PAGE result of synthetic mRNA



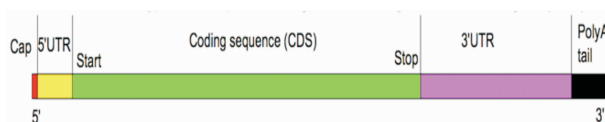


图 5 真核 mRNA 结构

Fig 5 The structure of eukaryotic mRNA

2.5 ELISA 检测 mRNA 在小鼠体内的表达 ELISA 法检测 3 组小鼠血清中的 FGF1 含量,结果如图 6。实验组(92.48 pg/mL)血清中 FGF1 的含量显著高于空白对照组(13.59 pg/mL)和鱼精蛋白对照组(15.54 pg/mL),说明 mRNA 进入体内并成功表达出 FGF1 蛋白,空白与鱼精蛋白对照组 FGF1 蛋白含量的差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

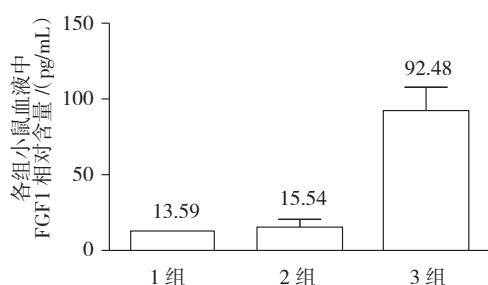


图 6 ELISA 检测血清中重组人 FGF1 蛋白的含量

Fig 6 Human FGF1 content was identified by ELISA

### 3 讨论

基因治疗作为一种新的治疗手段受到广泛认可,mRNA 因其自身优势而逐渐受到重视。体外转录 mRNA 后导入体内表达,可翻译成具有功能的蛋白质<sup>[6]</sup>,得到的蛋白是真核表达的,且具有自体同源性<sup>[7]</sup>,与体外表达得到的蛋白相比,减少了 MHC 限制等排斥反应及其他潜在的不安全因素。同时 mRNA 稳定性的问题也随着研究的逐步深入而破解,Petsch 等<sup>[4]</sup>体外合成特异性 mRNA 并开发出新型抗流感疫苗,实现了设计并体外转录 mRNA 在体内表达的成功应用。

真核 mRNA 结构包括 5' cap、5' UTR、开放阅读框、3' UTR 和 polyA 尾等部分,各部分均与稳定性密切相关。研究显示,使用帽子类似物 ARCA 或者牛痘病毒加帽系统代替常规的帽子结构,可显著提高 mRNA 的翻译率,而翻译常常被作为稳定性的一个标准。常规帽子类似物添加方向具有不确定性,反向添加的帽子结构其甲基化会受到影响,故而翻译效率大大下降<sup>[8]</sup>;而且 ARCA 本身在细胞中就具有较长的半衰期<sup>[9]</sup>。PolyA 中碱基数对 mRNA 稳定性也起到重要作用,该结构能够增加 mRNA 的稳定性和蛋白的表达<sup>[10]</sup>,polyA 的减少意味着 mRNA 的衰退。当腺苷酸残基 A 少于约 20 nt 时,mRNA 便不能结合多聚 A 结合蛋白(PABP)进行翻译,mRNA 就

会进入降解程序<sup>[11]</sup>。mRNA 的降解与 UTR,尤其是 3' UTR 的末端有密切关系,对 UTR 的优化常通过使用 globin 的 UTR。非洲爪蟾  $\beta$  globin 的 5' 和 3' UTR 对体外转录的稳定性有重要的意义<sup>[12]</sup>,已有研究表明,globin 5' UTR 提高了翻译效率而 3' UTR 增加了 mRNA 的稳定性<sup>[13]</sup>。另有研究发现,编码 globin、胶原蛋白及免疫球蛋白等常见蛋白的 mRNA 相对来说会更稳定<sup>[14]</sup>。本研究序列设计中也引入 globin UTR 来稳定体外转录合成的 mRNA。开放阅读区 GC 含量高的 mRNA 会更加稳定,CUREVAC GMBH<sup>[15]</sup>通过在野生型基础上增加 GC 含量,构建 GC 稳定型序列。不同种属密码子具有选择偏好,个体内同一种氨基酸的不同 tRNA 可能有差别,当相应 tRNA 较少时,可能会大大减缓翻译的进行<sup>[16]</sup>。鱼精蛋白结合 mRNA 后能够抵抗血清对 mRNA 的降解而起到稳定作用<sup>[9]</sup>。一些研究发现,鱼精蛋白与 mRNA 结合的复合体通过 TLRs 受体作用,对人和小鼠的免疫细胞有很强的活化作用<sup>[17]</sup>。

本研究参照 RNA 稳定性理论及前期研究基础,通过对载体 pT7TS 进行加 5'UTR、3'UTR、polyA 等结构优化,以及适当调整酶切位点,获得了优化的体外转录载体。选用 pT7TS 是由于该质粒含有能被噬菌体 RNA 聚合酶特异性识别的 T7 启动子,T7 较其他如 SP6 启动子等有更好的转录速率。pT7TS 通过其酶切位点能够保证 3'、5'UTR、polyA 序列的加入,也能确保后期单酶切使质粒线性化,满足转录的要求。在此基础上插入 GC 含量增加、密码子优化并二级结构初步分析后的 FGF1 序列,聚合酶转录合成的同时加入了 5'cap 结构,在序列设计上保证了目的 mRNA 在细胞内外的相对稳定性,5'cap 结构保证识别核糖体和启动合成蛋白。纯化后的 mRNA 与鱼精蛋白结合后,抵抗 RNA 酶的消化<sup>[9]</sup>,进一步增加了 mRNA 体内稳定。通过电泳及 ELISA 结果看到,研究中成功合成了目的 mRNA 并在体内实现了表达。

在合成稳定 mRNA 自身安全性的基础上,通过氯化锂沉淀法可以去除寡核苷酸、无机盐和大部分蛋白。而用 HPLC 方法<sup>[18]</sup>对产物进一步纯化,可以适应更高纯度 mRNA 使用的需求。

本研究成功完成了 FGF1 稳定性 mRNA 的体外合成并在体内表达出目的蛋白。获得的 FGF1 蛋白是机体自身翻译产物,与异体甚至原核表达的蛋白相比,避免了 MHC 限制等排斥反应以及其他不安全因素。尽管 FGF1 作用机制尚未完全明确,且本

(下转第 384 页)

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 polyubiquitin 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 $\gamma$ -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)