

人呼吸道合胞病毒 Long 株的免疫原性初探

李 华 杨 婷 岳 磊 刘正玲 姜广菊 龙润乡 杨 蓉 罗芳宇 谢忠平

摘 要 **目的** 评价人呼吸道合胞病毒(HRSV)Long 株的免疫原性,为进一步的研究疫苗提供实验数据。**方法** 将 HRSV 制备成纯化抗原,取 40 只 ICR 鼠,随机分为 4 组,分别用纯化 HRSV、纯化 HRSV + $\text{Al}(\text{OH})_3$ 、并设 0.01 mol/L PBS、 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 对照组,0 天、28 天免疫小鼠,采用中和试验检测血清中和抗体,流式检测 7 种细胞因子。**结果** 初免后 28 天,加 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 组与无 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 组抗体阳转率分别为 60% 和 50%,抗体几何平均效价(GMT)分别为 1:4.49 和 1:5.27;加强免疫后, $\text{Al}(\text{OH})_3$ 组与无 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 组小鼠血清抗体阳转率均达 100%,抗体几何平均效价(GMT)分别为 1:17.15 和 1:10.56,平均增长 3.8 倍和 2.0 倍;中和抗体在组间无差异,而组内初免与再免的中和抗体有统计学差异($P < 0.01$)。加 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 样品组与无 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 样品组,所检测 7 种细胞因子均诱导 IL-6 及 TNF,与两个对照组间有统计学差异($P < 0.05$),而另外 5 种细胞因子则无明显升高。**结论** 人呼吸道合胞病毒 Long 株可产生良好的免疫效应。

关键词 人呼吸道合胞病毒 Long 株 细胞因子 免疫原性

[中图分类号] R373.1

[文献标识码] A

Evaluation of the Immunogenicity of Human Respiratory Syncytial Virus Long Strain in Mice. Li Hua, Yang Ting, Yue Lei, et al. Institute of Medical Biology, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Science, Yunnan Provincial Engineering and Technological Research Center for Development of Vaccines against Major Infectious Diseases, Yunnan Provincial Key Laboratory for Development of Vaccines against Major Infections Disease, Yunnan 650118, China

Abstract Objective To evaluate immunogenicity of human respiratory syncytial virus (HRSV) Long strain and provide experimental data for further research. **Methods** HRSV was prepared as purified antigen by cell culture, column chromatography. Then, forty 4-week-old ICR mice were divided into four groups and inoculated twice with HRSV, HRSV + $\text{Al}(\text{OH})_3$, PBS, and $\text{Al}(\text{OH})_3$ respectively at 0 and 28 days. The serum neutralizing antibody titer was analyzed by micro-neutralization test in vitro and various cytokines were determined by flow cytometry. **Results** Seroconversion rates of HRSV + $\text{Al}(\text{OH})_3$ group and HRSV group were 60% and 50% at 28 days after the first inoculation, and antibody geometric mean titers (GMT) were 1:4.49 and 1:5.27. Seroconversion rates of HRSV + $\text{Al}(\text{OH})_3$ group and HRSV group were 100% at 7 days after the second inoculation, and antibody geometric mean titers (GMT) were 1:17.15 (3.8-fold) and 1:10.56 (2-fold). Neutralizing antibodies between HRSV + $\text{Al}(\text{OH})_3$ group and HRSV group had no differences, while neutralizing antibodies between the inoculations had significantly differences ($P < 0.01$). IL-6 and TNF of HRSV + $\text{Al}(\text{OH})_3$ group and HRSV group both increased significantly compared with control group ($P < 0.05$). **Conclusion** Human respiratory syncytial virus (HRSV) Long strain can induce immune response effectively.

Key words Human respiratory syncytial virus(HRSV); Long strain; Cytokine; Immunogenicity

人类呼吸道合胞病毒(human respiratory virus, HRSV)是世界范围内婴幼儿病毒性下呼吸道感染最重要的病原体,尤见于婴幼儿、老年人及免疫缺陷病人等急性呼吸道感染住院者^[1]。据估计,每年在世界范围内有 3400 万~6500 万的呼吸道合胞病毒感染

染病例和 16.0 万~19.9 万死亡病例^[2],仅在美国,呼吸道合胞病毒导致每年住院大约 12.5 万例^[3]。在发展中国家,RSV 在婴幼儿引起急性下呼吸道感染的病死率比较高^[4]。由于该病毒的高感染率,在 1 岁前近 70% 的儿童就被首次感染,更重要的是,2 岁以下婴儿大约 36% 至少感染两次^[2,5]。从 1956 年 Morris 等首次发现该病毒至今,RSV 感染引起的社会经济负担实际上比季节性流感更加严重,给国家和个人带来极大的损失^[6]。

虽然 HRSV 疫苗的研究已有 50 多年的历史,但至今尚无被批准使用的产品。因此,WHO 已将呼吸

基金项目:国家高技术研究发展计划(863)基金资助项目(2012AA02A404);云南省应用基础研究面上项目(2011FZ210)

作者单位:650118 昆明,中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所云南省重大传染病疫苗工程技术研究中心,云南省重大传染病疫苗研发重点实验室

通讯作者:谢忠平,电子信箱:xzp218@126.com

道合胞病毒疫苗列为 21 世纪需要优先解决的问题之一。由于 HRSV 自然感染激发的机体免疫是不完全免疫,需再次或多次的 HRSV 感染才能完善,疫苗需要多次给药才能达到保护严重下呼吸道感染的免疫水平。因此,获得免疫原性高的病毒株,才能为后续制备 RSV 单克隆抗体及裂解疫苗的研究打下基础。鉴于 RSV 感染后,T 细胞亚群、细胞因子在致病和抗病中有着重要的作用。对 Th1/Th2 细胞因子的研究,在 RSV 疫苗及治疗药物方面有着积极意义。至今对 RSV 的研究已经涉及很多方面,但对 RSV A 亚型 Long 株免疫原性的基础研究还未见报道,现将结果报道如下。

材料与方法

1. 材料:(1)细胞和病毒:Hep-2 细胞、KMB₁₇ 细胞由本所质量检定室提供;RSV Long 株购于中国典型培养物保藏中心。(2)主要仪器和试剂:BD FACSCanto II 流式细胞仪为 BD 公司产品;酶联免疫分析仪/多功能生物检测仪为美国 BIOTEK 公司产品;Bio-RAD Chemi Doc™ Imaging System 为美国 BIO-RAD 公司产品;一抗:兔抗 RSV IgG 为美国 IMG-ENEX 公司产品;羊抗兔-HRP 为 abcam 公司产品;Al(OH)₃ 佐剂(浓度为 2.0mg/ml)为本所甲肝疫苗生产室自制;BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit (lot:3072948), 购于 BD 公司;化学发光底物:Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate (lot:1131801), 购于 Millipore 公司。(3)实验动物:清洁级 ICR(Institute of Cancer Research)小鼠,4 周龄,雌雄各半,体重 16~18g,由笔者单位灵长类中心小动物部提供,实验动物合格证号:SYXK(滇)2010007。

2. 方法:(1)实验性疫苗制备:取生长状态良好的致密单层 Hep-2 细胞,培养并收获病毒;初纯、超滤浓缩;选择 Sepharose 4FF 凝胶^[8]纯化,用双抗体夹心法检测 RSV 抗原含量,将 RSV 抗原含量高的不同收集样品合并即为纯化的 HRSV 样品,合并的样品用 30kDa 的超滤离心管,4000r/min,20min 离心浓缩。纯化 HRSV 加 Al(OH)₃ 或不加 Al(OH)₃ 制备成为实验组样品。(2)纯化产物的检测:不同纯化收集的产物经 SDS-PAGE 电泳;浓缩后样品用蛋白检测试剂盒 Pierce™ BCA Protein Assay Kit 检测蛋白含量,具体方法见试剂盒说明书;Western blot 法鉴定 SDS-PAGE 电泳,半干转印至 PDVF 膜上,以 5% 脱脂奶粉 37℃ 封闭 1h 后,加一抗(兔抗 RSV IgG 多克隆抗体,浓度 1:500)4℃ 过夜、加二抗(羊抗兔 IgG-HRP 1:500)37℃ 反应 1h,化学发光底物曝光显影。(3)免疫原性评价:选取 ICR 小鼠 40 只,随机分为 4 组,每组 10 只。2 组实验性样品:纯化 HRSV 组[无 Al(OH)₃ 佐剂]、纯化 HRSV + Al(OH)₃ 佐剂组[Al(OH)₃ 使用浓度为 1.0mg/ml];同时设两个对照组:0.01mol/L PBS(pH 7.4)对照组、Al(OH)₃ 对照组[0.01mol/L PBS(pH 7.4)配制的 1.0mg/ml Al(OH)₃ 佐

剂]。免疫注射剂量:每只 0.5ml,腹腔注射。免疫程序:分别于 0 天、28 天免疫,共免疫 2 次,于初免后 28 天、加强后 7 天采血分离血清,检测血清中和抗体效价及 IL-2、IL-4、IL-6、IFN-γ、TNF、IL-17A、IL-10 共 7 种细胞因子。(4)血清中和抗体效价检测:采用固定病毒稀释血清的微量中和试验法来检测血清中和抗体效价。待测血清 56℃ 灭活 30min 后,做 2 倍系列稀释,每稀释度 50 微升/孔,再加入 2000 CCID₅₀/ml 病毒 50 微升/孔,混匀,37℃ 中和 1h 后,加入 1×10⁶/ml 浓度的 Hep-2 细胞 100 微升/孔。置 37℃、4% CO₂ 孵箱中培养。同时设置病毒对照、细胞对照和阴性血清对照。于第 7 天判定结果。以抗体效价 ≥ 1:4 为阳性。(5)血清细胞因子的检测:用 BD 公司 BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit,流式细胞仪检测小鼠血清中的 IL-2 等 7 种细胞因子。具体方法见试剂盒说明书。

3. 统计学方法:使用 SPSS 13.0 软件进行数据的统计分析。分别对组间进行比较,对于不满足正态分布的,采用非参数检验的方法进行比较;满足正态分布且方差齐性,采用两独立样本的 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. Sepharose 4FF 凝胶过滤层析法纯化样品:收获病毒液感染性效价为 6.125lgCCID₅₀/ml,抗原效价为 1:64,纯化得率为 44.4%。Sepharose 4FF 凝胶过滤纯化曲线(图 1)。

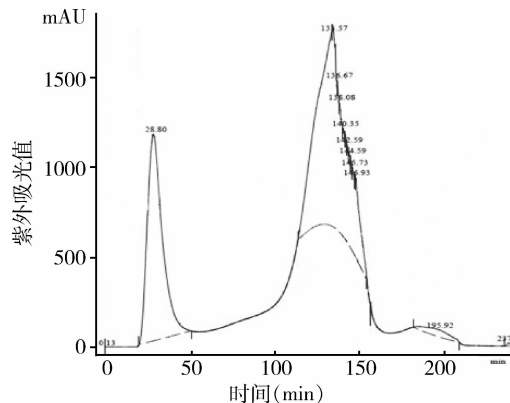


图 1 Sepharose 4FF 凝胶过滤层析法
纯化样品的纯化曲线

2. SDS-PAGE 电泳和 Western blot:经检测 RSV 抗原含量高的样品合并,用 50kDa 的离心管离心浓缩,即为实验样品,SDS-PAGE 电泳,Bio-Rad 的 Quantity One 软件分析表明,纯度达 95% 以上。Western blot 检测,可见为 3 个条带:G 蛋白 90kDa、F 蛋白 55kDa 及 N 蛋白 46kDa(图 2)。用蛋白检测试剂盒检测蛋白含量为 3.66mg/ml。

3. HRSV 纯化样品的中和抗体:将样品合并浓缩后,加 Al(OH)₃ 或不加 Al(OH)₃ 制备成实验性样品。经免疫程序(一免 1 针或二免 2 针)免疫 ICR 小

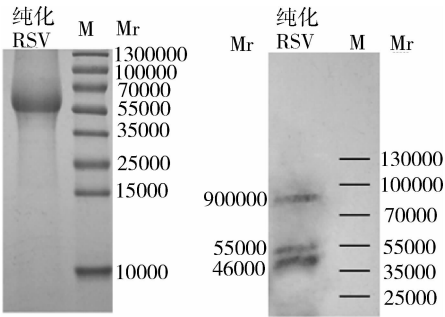


图 2 Sepharose 4FF 凝胶过滤层析法纯化样品的 SDS - PAGE 和 Western blot 结果

鼠, 每组 10 只, 每只腹腔注射 0.5ml 实验性样品。分别于一免后 28 天, 加强免疫后 7 天, 采血, 分离血清检测中和抗体效价(表 1), 一免后, 加 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 样品组与无 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 样品组的抗体阳转率分别为 60% 和 50%, 抗体效价分别为 1:4.49 及 1:5.27, 两组间抗体阳转率及 GMT 值均无统计学差异($P=0.409$)。二免后 2 个实验组抗体阳转率均升高为 100%, GMT 分别为 1:17.15 及 1:10.56, 均有明显增高, 与一免后结果相比差异有统计学意义($P<0.01$), 但 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 样品组与无佐剂病毒抗原组之间无统计学差异($P=0.220$)。

表 1 HRSV Long 株纯化样品免疫 ICR 小鼠中和抗体效价

中和抗体效价	纯化 HRSV + $\text{Al}(\text{OH})_3$		纯化 HRSV		$\text{Al}(\text{OH})_3$		0.01mol/L PBS	
	一免	二免	一免	二免	一免	二免	一免	二免
<1:4	4	0	5	0	10	10	10	10
1:4	5	1	3	2	0	0	0	0
1:8	1	3	2	4	0	0	0	0
1:16	0	2	0	2	0	0	0	0
1:32	0	2	0	2	0	0	0	0
1:64	0	2	0	0	0	0	0	0
动物总数	10	10	10	10	10	10	10	10
抗体阳性数	6	10	5	10	0	0	0	0
抗体阳转率(%)	60	100	50	100	0	0	0	0
中和抗体 GMT	1:4.49	1:17.15	1:5.27	1:10.56	0	0	0	0

1 组. 纯化 HRSV + $\text{Al}(\text{OH})_3$ 组, 0 天、28 天免疫组; 2 组. 纯化 HRSV 组, 不加 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 样品, 0 天、28 天免疫组; 3 组. $\text{Al}(\text{OH})_3$ 对照组; 4 组. 0.01mol/L PBS 对照组

4. 血清中细胞因子检测: 用 BD 公司 Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit 检测小鼠血清, 小鼠血清中的 IL - 2、IL - 4、IL - 6、IFN - γ 、TNF、IL - 17A、IL - 10 共 7 种细胞因子仅 IL - 6 及 TNF 2 种细胞因子显著上升, 其余 5 种皆无表达(图 3、图 4)。纯化 HRSV +

$\text{Al}(\text{OH})_3$ 组、纯化 HRSV 组、 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 对照组与 0.01mol/L PBS 对照组共 4 个组, 一免与二免(组内)、加 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 与不加 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 样品组(组间)之间, 其细胞因子 IL - 6、TNF 两种细胞因子组间皆有统计学差异($P<0.05$, 表 2)。

表 2 不同免疫组 IL - 6 与 TNF 两种细胞因子含量

细胞因子	纯化 HRSV + $\text{Al}(\text{OH})_3$		纯化 HRSV		$\text{Al}(\text{OH})_3$	0.01mol/L PBS
	一免	二免	一免	二免		
IL - 6	15.35 $\pm$ 3.51	37.52 $\pm$ 5.81	7.71 $\pm$ 2.38	13.46 $\pm$ 2.03	6.25 $\pm$ 4.01	4.16 $\pm$ 0.68
TNF	81.27 $\pm$ 13.11	111.49 $\pm$ 11.00	59.06 $\pm$ 7.29	74.96 $\pm$ 9.33	24.39 $\pm$ 2.33	24.67 $\pm$ 3.91

IL - 2、IL - 4、IL - 10、IFV - γ 、IL - 17A 含量均为 0

讨 论

针对传染病及流行病的预防, 传统经典疫苗是主要的研究方向, 所以应获得代表国内流行的病毒株, 且应能在体外高效增殖、遗传稳定性高、免疫原性好的优势毒株, 所以本实验对 HRSV Long 株进行免疫原性初步探索。

将纯化蛋白加入 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 或不加入 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 佐剂制备为实验样品组, 免疫 ICR 小鼠, 病毒中和试验结果表明, 第 1 次免疫后抗体阳转率达 60% 及 50%, 加强免疫后, 抗体阳转率皆达 100%, 抗体几何平均效价(GMT)分别为 1:17.15 和 1:10.56, 平均增长 3.8 倍和 2.0 倍, 但一免及二免后中和抗体铝佐

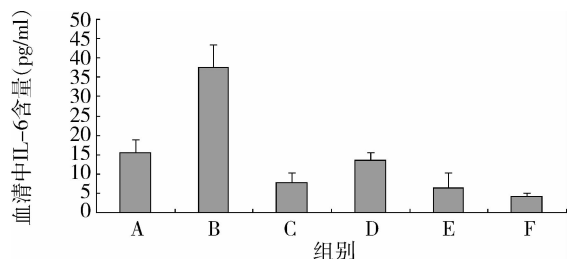


图3 纯化 HRSV Long 株免疫小鼠不同组别 IL-6 含量

A. 纯化 HRSV + Al(OH)₃ 组第 1 次免疫小鼠; B. 纯化 HRSV + Al(OH)₃ 组第 2 次免疫小鼠; C. 纯化 HRSV 组第 1 次免疫小鼠; D. 纯化 HRSV 组第 2 次免疫小鼠; E. Al(OH)₃ 对照组; F. 0.01mol/L PBP 对照组

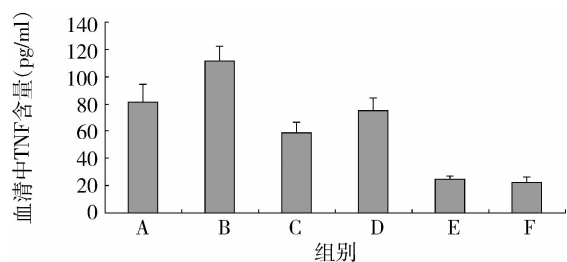


图4 纯化 RSV Long 株免疫小鼠不同组别 TNF 含量

A. 纯化 HRSV + Al(OH)₃ 组第 1 次免疫小鼠; B. 纯化 HRSV + Al(OH)₃ 组第 2 次免疫小鼠; C. 纯化 HRSV 组第 1 次免疫小鼠; D. 纯化 HRSV 组第 2 次免疫小鼠; E. Al(OH)₃ 对照组; F. 0.01mol/L PBP 对照组

剂组与无佐剂组 GMT 差异皆无统计学意义。抗体水平显著升高,但是效价较低,这与文献[7]报道的 RSV A2 株的免疫结果相符。实验虽然不是同一病毒株,但都属于 A 亚型,究其原因:是否由于 RSV 病毒是有包膜的病毒,经过病毒的初纯、超滤浓缩、凝胶纯化及再浓缩(超滤离心)一系列处理对病毒的影响所导致。

另一个原因是否由于该毒株的生物学特性及基因编码与其他病毒的具体差异所致,在获得 RSV Long 株后,对病毒株扩大培养至第 5 代,并进行 RT-PCR 扩增病毒的 F 基因、G 基因及 N 基因,将测序结果进行比对(比对株 GenBank 登录号:AY911262.1): RSV-N 蛋白核苷酸同源率为 97.48%, RSV-F 蛋白为 94.01%, RSV-G 蛋白为 99.78%。该毒株的 F 蛋白同源率较 G 蛋白低,与文献[8]报道不一致,但都大于 90.00%,同源性的差异是否与血清效价有直接关系,有待进一步实验。

20 世纪 60 年代研制的甲醛灭活疫苗(F1-RSV)的研究发现,HRSV 灭活疫苗具有疾病加强作

用,可能原因是破坏了小鼠辅助性 T 细胞 Th1 和 Th2 亚群动态平衡状态[9]。本次研究小鼠血清的细胞因子实验结果显示,仅有 IL-6 及 TNF2 种细胞因子升高,而 IFN- γ 、IL-4、IL-2 皆未升高。实验中 Al(OH)₃ 佐剂的使用,主要于注射位点的沉积,诱导动物模型的 Th2 型免疫应答,但结果显示佐剂的使用并未显著增加 HRSV 的免疫效果,所产生的抗体与无佐剂组无显著差异[10]。所以该 RSV Long 株所诱导的免疫是平衡的,未见明显的疾病加强指标。

另外,IL-6 及 TNF 2 种细胞因子的升高,是否可以从以下得到解释:Levitz 等[11]报道无论是在体内和体外,IL-6 促炎细胞因子是宿主对呼吸道合胞病毒感染的反应产物。Pribul 等[12]发现肺部早期趋化因子分泌的峰值是由巨噬细胞驱动,肺泡巨噬细胞受激活导致大量促炎症细胞因子的产生包括 MIP1 α 、TNF- α 、IL-6、IL-8。实验所检测的 IL-6 及 TNF2 种细胞因子升高,是否由于肺泡巨噬细胞激活所致尚待进一步证实。Choi 等[13]报道肿瘤坏死因子(TNF)与儿童呼吸道感染 RSV 引起嗜酸性粒细胞炎症有关。研究还发现,人外周血多形核粒细胞(PMN)感染 RSV 后可分泌 IL-6 且 IL-6 的含量与接触病毒的数量有密切关系,Grell 等报道的 IL-6 的产生呈现年龄依赖性,即年龄越小的动物越容易产生。

综上所述,如何在保持免疫原性的基础上,使 RSV 病毒样品能诱导平衡的 Th1/Th2 反应,增加疫苗的安全性,是 RSV 疫苗研究的关键。本实验初步探讨了 RSV Long 株抗原的免疫原性,从实验结果分析,本研究所制备的 HRSV 能诱导产生明显的体液免疫及细胞免疫,为进一步系统研究 HRSV 疫苗提供了实验资料。

参考文献

- Robinson KA, Odelola OA, Saldanha IJ, et al. Palivizumab for prophylaxis against respiratory syncytial virus infection in children with cystic fibrosis[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2012, 2: CD007743
- Schmidt MR, McGinnes LW, Kenward SA, et al. Long-term and memory immune responses in mice against newcastle disease virus-like particles containing respiratory syncytial virus glycoprotein ectodomains[J]. J Virology, 2012, 86(21):11654-11662
- Storey S. Respiratory syncytial virus market. Nature reviews[J]. Drug Discovery 2010, 9: 15-16
- Nair H, Nokes DJ, Gessner BD, et al. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis[J]. Lancet, 2010, 375: 1545-1555
- 张竞, 阎浩林, 梅兴国. 呼吸道合胞病毒(RSV)与 Th1/Th2 细胞

- 因子的关系研究进展[J]. 沈阳药科大学学报, 2008, 25(12): 1016-1020
- 6 金奇, 毕胜利, 陈继明. 医学分子病毒学[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 461-479
- 7 董莉娟, 李华, 蒋蕊鞠, 等. 人呼吸道合胞病毒不同纯化方法的比较研究[J]. 医学研究杂志, 2011, 40(4): 73-76
- 8 李光, 井申荣. 呼吸道合胞病毒蛋白的研究进展[J]. 中国生物制品杂志, 2006, 19(5): 541-547
- 9 Brewer JM, Conacher M, Satosker A. *et al.* In interleukin-4-deficient mice, alum not only generates T helper 1 responses equivalent to Freund's complete adjuvant, but continues to induce T helper 2 cytokine production[J]. EUR J Immunol, 1996, 26(9): 2062-2066
- 10 Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW. *et al.* Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins[J]. J Immunol. 1986, 136(7): 2348

- 2357
- 11 Levitz R, Wattier R, Phillips P, *et al.* Induction of IL-6 and CCL5 (RANTES) in human respiratory epithelial (A549) cells by clinical isolates of respiratory syncytial virus is strain specific [J]. Virol, 2012, (190)9: 1-9
- 12 Pribul PK, Harker J, Wang B, *et al.* Alveolar macrophages are a major determinant of early responses to viral lung infection but do not influence subsequent disease development [J]. J Virol, 2008, 82(9): 4441-4448
- 13 Choi J, Callaway Z, Kim HB, *et al.* The role of TNF- α in eosinophilic inflammation associated with RSV bronchiolitis [J]. Pediatric Allergy Immunology, 2010, 21: 474-479

(收稿日期: 2013-12-25)

(修回日期: 2013-12-30)

人结肠癌细胞 Drosha 基因敲除细胞模型的构建

李芸乔 李尚泽 宋 伟 王任先 张晓东 王琳芳

摘 要 **目的** 为研究核酸酶 Drosha 与结直肠癌的关系, 利用腺相关病毒 (AAV) 介导的染色体同源重组技术, 构建 Drosha 基因敲除的 HCT116 结直肠癌细胞模型。**方法** 设计引物通过 PCR 扩增 Drosha 基因的同源臂, 构建 Drosha 的 AAV 病毒打靶载体, 通过病毒的包装、感染、抗生素新霉素 (G418) 药物筛选、PCR 以及 Western blot 鉴定获得基因敲除阳性细胞株, 通过 Cre 病毒感染去除抗性基因, 最终建立敲除 Drosha 基因的结直肠癌细胞模型。**结果** 经过两轮打靶, 分别将 DNA 双链上的 Drosha 基因去除并经 Western blot 鉴定, 获得 Drosha-/- 阳性的 HCT116 细胞株。**结论** 通过 AAV 病毒介导的染色体同源重组技术, 成功构建 Drosha 基因敲除的 HCT116 细胞系。

关键词 基因敲除 Drosha 同源重组 结直肠癌

[中图分类号] R735 [文献标识码] A

Establishment of Drosha -/- cell Model in HCT116. Li Yunqiao, Li Shangze, Song Wei, *et al.* State Key Laboratory of Medical Molecular Biology, Institute of Basic Medical Sciences, CAMS and School of Basic Medicine, PUMC, Beijing 100005, China

Abstract Objective To investigate the role of Drosha involved in colorectal tumorigenesis, the AAV-mediated homologous recombination technology was developed to construct a human colorectal cell in which Drosha is completely deleted. **Methods** The homologous arms for AAV-targeted deletion of Drosha were amplified by PCR from HCT116 genomic DNA and cloned into the AAV expression vectors, which were packaged into 293T cells to produce the live viruses. HCT116 cells were infected by the viruses and the positive cells were identified by G418 selection, PCR screening and Western blot. Finally, the neomycin gene in the identified cells was removed by the Cre virus. **Results** Drosha-/- positive cell clones were successfully constructed after G418 selection, PCR screening, Western blot and Cre virus infection. **Conclusion** The HCT116 Drosha-/- cell was successfully established by AAV-mediated deletion technology.

Key words Knock out; Drosha; Homologous recombination; Colorectal cancer

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81372661); 国家重点实验室专项基金资助项目 (2060204)

作者单位: 100005 中国医学科学院基础医学研究所/北京协和医学院基础学院、医学分子生物学国家重点实验 (李芸乔、宋伟、王任先、王琳芳); 430072 武汉大学生命科学院细胞与发育生物学系 (李尚泽、张晓东)

通讯作者: 王琳芳, 电子信箱: wang.linfang@imicams.ac.cn

随着世界环境的恶化以及各种诱发因素的增加, 癌症的发生率逐年升高, 目前癌症已成为发达国家人口死亡原因的第 1 位, 发展中国家人口死亡原因的第 2 位^[1]。结直肠癌作为近年来发生率和病死率上升最快的肿瘤之一, 已经越来越受到人们的广泛关注^[2]。因此, 从细胞、分子水平探讨结直肠癌的发病