

- phism in cirrhosis: relationship with the aetiology of liver disease and hepatocellular carcinoma occurrence[J]. *Liver Int.*, 2011, 31(8): 1137 – 1143
- 7 Falleti E, Cussigh A, Cmet S, *et al.* PNPLA3 rs738409 and TM6SF2 rs58542926 variants increase the risk of hepatocellular carcinoma in alcoholic cirrhosis[J]. *Dig Liver Dis*, 2016, 48(1): 69 – 75
- 8 Nischalke HD, Berger C, Luda C, *et al.* The PNPLA3 rs738409 148M/M genotype is a risk factor for liver cancer in alcoholic cirrhosis but shows no or weak association in hepatitis C cirrhosis[J]. *PLoS One*, 2011, 6(11): e27087
- 9 Friedrich K, Wannhoff A, Kattner S, *et al.* PNPLA3 in end – stage liver disease: alcohol consumption, hepatocellular carcinoma development, and transplantation – free survival[J]. *Gastroenterol Hepatol*, 2014, 29(7): 1477 – 1484
- 10 Valenti L, Motta BM, Soardo G, *et al.* PNPLA3 I148M polymorphism, clinical presentation, and survival in patients with hepatocellular carcinoma[J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e75982
- 11 Ezzikouri S, Alaoui R, Tazi S, *et al.* The adiponutrin I148M variant is a risk factor for HCV – associated liver cancer in North – African patients[J]. *Infect Genet Evol*, 2014, 21: 179 – 183
- 12 Liu YL, Patman GL, Leathart JB, *et al.* Carriage of the PNPLA3 rs738409 C > G polymorphism confers an increased risk of non – alcoholic fatty liver disease associated hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2014, 61(1): 75 – 81
- 13 高超, 王霞, 李立红, 等. PNPLA3 基因多态性与原发性肝癌遗传易感性的相关研究[J]. *中国医学创新*, 2014, 11(18): 12 – 14
- 14 Hao L, Ito K, Huang KH, *et al.* Shifts in dietary carbohydrate – lipid exposure regulate expression of the non – alcoholic fatty liver disease – associated gene PNPLA3/adiponutrin in mouse liver and HepG2 human liver cells[J]. *Metabolism*, 2014, 63(10): 1352 – 1362
- (收稿日期: 2015 – 11 – 19)
(修回日期: 2015 – 11 – 30)

hsa – microRNA – 96 – 5p down 慢病毒 表达载体的构建与鉴定

竺王玉 张玉惠 张伟忠 董金良 梁金荣

摘 要 **目的** 构建 hsa – microRNA – 96 – 5p down 慢病毒表达载体并对其进行鉴定。**方法** 根据 hsa – miR – 9 – 5p 基因序列设计合成 hsa – miR – 96 – 5p – inhibition – a 和 hsa – miR – 96 – 5p – inhibition – b, 将合成后成对的引物干粉溶解于退火缓冲液中引物退火。将慢病毒 GV280 载体酶切产物通过 T4DNA 连接酶将双酶切线性化的载体和退火双链 DNA 连接。经菌落筛选, 菌落 PCR 及测序鉴定, 荧光法及药筛法测定病毒效价。**结果** 菌落 PCR 和测序验证成功构建了 hsa – miR – 96 – 5p down 慢病毒载体, 经荧光法及药筛法测定病毒效价为 3×10^8 TU/ml。**结论** 成功构建了 hsa – miR – 96 – 5p down 慢病毒表达载体, 为后续深入研究 miR – 9 – 5p 在肺癌细胞中的生物学行为及机制提供了前期实验基础。

关键词 hsa – miR – 96 – 5p 慢病毒载体 肺癌

中图分类号 R972 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.06.028

Construction and Identification of Hsa – micorRNA – 96 – 5p Down Lentivirus Expression Vector. Zhu Wangyu, Zhang Yuhui, Zhang Weizhong, *et al.* Department of General Surgery, Cell and Molecular Biology Laboratory, The Affiliated Zhoushan Hospital of Wenzhou Medical University, Zhejiang 316021, China

Abstract Objective To construct and identify a hsa – micorRNA – 96 down lentivirus expression vector. **Methods** According to the gene sequence of hsa – microRNA – 96, we designed and synthesized two pairs of single stranded oligonucleotides hsa – microRAN – 96 – 5p – inhibition – a and hsa – miR – 96 – 5p – inhibition – b. The powder of primers was then dissolved in the annealing buffer and to be annealed. The double enzyme digested GV280 lentivirus vectors were linked to the annealing double – stranded DNA via T4 DNA ligase. The constructed recombinant vectors were identified by single colony PCR and DNA sequencing after the colony isolation. The concentration of lentivirus was detected by the fluorescence and drug screening method. **Results** The single colony PCR and DNA sequencing confirmed that the purpose anti – hsa – microRNA – 96 oligonucleotide was correctly inserted into the lentivirus vectors. The concen-

基金项目: 浙江省科技厅公益类项目(2014C33244); 舟山市科技局项目(2012C13023, 2011C12040, 2014C31063)

作者单位: 316021 浙江省舟山医院细胞分子生物学实验室(竺王玉), 普外科(张玉惠、张伟忠、董金良、梁金荣)

通讯作者: 梁金荣, 电子信箱: zhuwangyu24@sina.cn

tration of lentivirus was 3×10^8 TU/ml determined by the fluorescence and drug screening method. **Conclusion** It could be concluded that hsa-microRNA-96 down lentivirus expression vector was successfully constructed and identified, providing an experimental basis for further study on the biological behavior of microRNA-96 and its mechanism in lung cancer cells.

Key words Hsa-miR-96-5p; Lentivirus expression vector; Lung cancer

microRNAs (miRNAs) 是一类非编码低分子 RNA, 通过与目标 mRNA 的 3'UTR 互补配对, 导致 mRNA 降解或抑制转录后翻译诱导基因沉默, 从而调控一系列的生命活动并参与疾病的发生、发展过程。已有研究证实, miRNAs 在肺癌发生发展中起重要的调控作用, 参与肺癌的发展进程。hsa-microRNA-96 (miR-96), 为 miR-183 家族成员之一, 是新报道的一种 miRNAs 分子, 在多种癌症中表达上调。在前期研究中, 笔者应用基因芯片及 qRT-PCR 技术均证实 miR-96 在肺肿瘤组织中呈现过表达, 而在正常的肺黏膜组织中则不表达或呈现低表达; 过表达 miR-96 是肺癌发生的危险因素, 且与患者生存时间减少有关, 提示 miR-96 水平增高为肺癌发生、发展过程中的一个高频事件, 可能通过介导抑癌基因失活参与肺癌的发生, 然而, 对其在参与肺癌发生、发展的具体作用及其分子机制仍有待深入研究阐明^[1, 2]。在本研究中, 笔者拟构建 miR-96 的慢病毒表达载体, 并鉴定其表达活性, 为后续研究 miR-96 在肺癌发生中的作用机制及基于 miR-96 的肺癌基因治疗策略开发提供前期实验基础。

材料与方法

1. 质粒、菌株及试剂: GV280 慢病毒载体, pHelper 1.0 载体和 pHelper 2.0 载体 (吉凯基因公司); Top10 感受态细胞 (Genechem 公司), 限制性内切酶 Age I & EcoR I (NEB 公司), Taq DNA 聚合酶 (Vazyme 公司), T4 DNA 连接酶和 GeneRuler 1kb DNA ladder (Thermo Scientific 公司), 质粒抽提试剂盒 (天根生化科技有限公司), NormalRun™ 250bp - II DNA ladder 和引物 (上海捷瑞公司), 测序验证 (金斯瑞公司), puromycin (Sigma - Aldrich 公司), 293T 细胞为本实验室保存细胞。

2. 合成 Oligo 信息: 搜索 miRBase 数据库 (<http://www.mirbase.org>), 得到 hsa-miR-96-5p 成熟序列, 并据此得出其反向互补序列: 5'-AGCAAAAATGTGCTAGTGCCAAA-3'。hsa-miR-96-5p-inhibition-a: 5'-AATTCAAAAATTTGGCACTAGCA-CATTTTTTGCT-3', hsa-miR-96-5p-inhibition-b: 5'-CCGGAGCAAAAATGTGCTAGTGCCAAAATTTTG-

3'。合成后成对的引物干粉溶解于退火缓冲液中, 90℃ 水浴 15min, 自然冷却至室温。hsa-miR-96-5p-inhibition-a 和 hsa-miR-96-5p-inhibition-b 理论配对结果如下: 5'-AATTCAAAAATTTGGCAC-TAGCACATTTTTGCT-3' 连接 3'-GTTTTTAAACCGT-GATCGTGTA AAAACGAGGCC-5'。

3. 载体构建与鉴定: 将 GV280 载体用限制性内切酶 Age I & EcoR I 进行酶切, 37℃ 反应过夜。对载体酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳, 回收目的条带。通过 T4DNA 连接酶将双酶切线性化的载体和退火双链 DNA 连接, 16℃ 连接过夜。将 10μl 交换反应的物加入到 100μl 感受态细胞中, 轻弹管壁数下混匀, 在冰上放置 30min。42℃ 热激 90s 后冰水浴孵育 2min, 将适量菌液均匀涂布于 LB (Amp⁺) 平板上倒置培养 12~16h。无菌枪头挑取阳性克隆分别进行菌液 PCR, 15g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定。将鉴定出的阳性克隆转化子接种于 LB (Amp⁺) 液体培养基中培养 12h 后进行质粒小量提取, 并送南京金斯瑞生物科技有限公司测序验证。将测序正确的菌液转接于 LB (Amp⁺) 液体培养基中培养过夜后, 无内毒素质粒小提中量试剂盒抽提合格质粒。

4. 慢病毒颗粒的包装与效价测定: 取对数生长期的 293T 细胞, 调整细胞密度至 5×10^6 细胞/15ml, 接种于 10cm 细胞培养皿, 37℃, 5% CO₂ 培养 24h。待细胞密度达 70%~80% 时, 将携带靶序列的 GV280 载体与病毒包装辅助质粒 (pHelper 1.0 和 pHelper 2.0) (GV280 载体质粒 20μg, pHelper 1.0 载体质粒 15μg 和 pHelper 2.0 10μg) 共转染 293T 细胞, 在转染后 48h 后收集细胞上清, 4℃、4000 × g 离心 10min 除去细胞碎片后, 用 0.45μm 的滤器过滤, -80℃ 分装保存。取 10μl 收集的病毒原液, 用无血清培养基按 10^{-1} 到 10^{-6} 比例梯度稀释, 重复 3 孔, 每孔加入 50μl 病毒稀释液感染 293T 细胞。感染 24h 后, 每孔换 1ml 新鲜培养液, 继续培养。48h 后, 观察并找出 GFP 荧光细胞比例在 10% 左右的稀释梯度, 记录下该梯度稀释液感染的各孔中荧光细胞的数目, 取平均值, 计算病毒效价。另外还采用药筛法测定效价, 将病毒感染 293T 细胞 72h 后加入抗性药物 puromy-

cin, 维持药物浓度 $5\mu\text{g}/\text{ml}$, 继续培养 1 天, 观察细胞生长状况。

结 果

1. hsa - miR - 96 - 5p down 慢病毒表达载体 PCR 鉴定及测序鉴定: 连接入 vshRNA 片段的 miR - 96 - 5p - inhibition 阳性克隆 PCR 片段大小为 542bp, 空载体克隆 PCR 片段为 508b(图 1A)。1#为阴性对照(ddH₂O), 2#阴性对照(空载体自连对照组), 4# ~ 8#为 miR - 96 - 5p - inhibition 转化子。图 1B 为 hsa - miR - 96 - 5p down 慢病毒表达载体测序峰图(207 ~ 238), 序列为 5' - CCGGAGCAAAAATGTGCTAG TGCCAAATTTTT - 3'。

2. miR - 96 慢病毒颗粒的包装及病毒效价测定: 将携带靶序列的 GV280 载体与病毒包装辅助质粒(pHelper 1.0 和 pHelper 2.0)共转染 293T 细胞, 所得病毒悬液梯度稀释后感染 293T 细胞, 成功地进行了病毒包装, 并应用荧光法和药筛法进行病毒效价测定, 最终在 $1 \times 10^{-5}\mu\text{l}$ 病毒原液中观察到 3 个荧光细胞或活细胞, 公式为病毒效价 = 荧光细胞数(活细胞数)/病毒原液量 = $3/10^{-5}\text{TU}/\mu\text{l} = 3 \times 10^8\text{TU}/\text{ml}$ 。

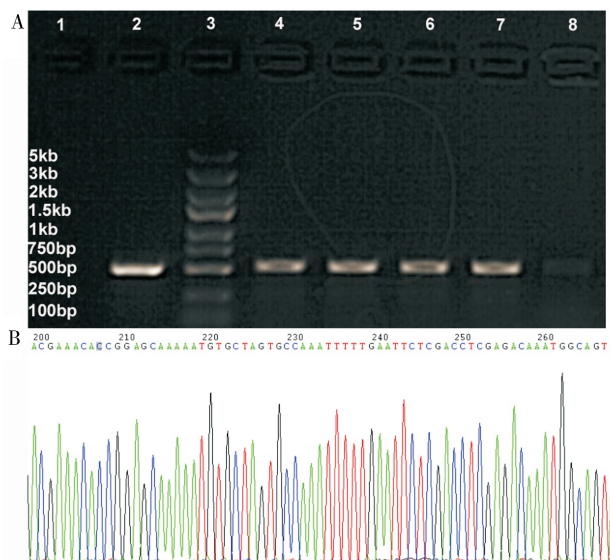


图 1 hsa - miR - 96 - 5p down 慢病毒表达载体 PCR 鉴定及测序鉴定

A. hsa - miR - 96 - 5p down 慢病毒表达载体 PCR 鉴定图; B. hsa - miR - 96 - 5p down 慢病毒表达载体测序峰图

hsa - miR - 96 - 5p down 慢病毒的有效效价在 $3 \times 10^8\text{TU}/\text{ml}$, 图 2。

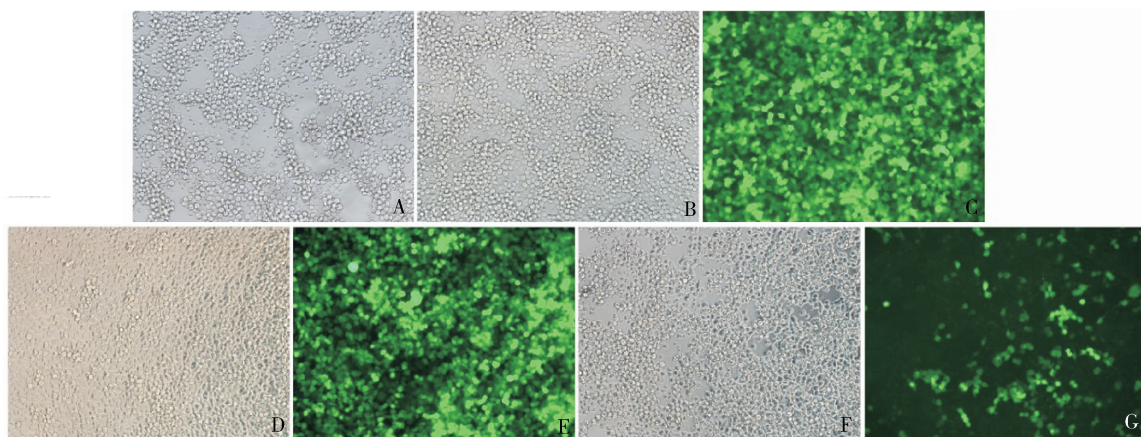


图 2 慢病毒感染 293T 细胞后 GFP 表达情况 ($\times 200$)

A. 空白对照组; B. $10\mu\text{l}$ 病毒原液; C. $10\mu\text{l}$ 病毒原液; D. $1\mu\text{l}$ 病毒原液; E. $1\mu\text{l}$ 病毒原液; F. $10^{-1}\mu\text{l}$ 病毒原液; G. $10^{-1}\mu\text{l}$ 病毒原液

讨 论

近年来的研究表明, miR - 96 在包括肺癌的多种恶性肿瘤中均存在异常表达, 并参与调控肿瘤细胞的增殖、凋亡及侵袭转移过程^[3~6]。Li 等^[5]检测 68 对非小细胞肺癌组织及相应正常组织 miR - 96 表达, 发现与正常肺组织比较, miR - 96 在非小细胞肺癌中表达异常增高, 且与淋巴结转移有关。进一步研究证实, miR - 96 通过靶向下调叉形头转录因子 O3 (fork-head box O3, FOXO3) 表达参与非小细胞肺癌凋亡和

侵袭转移。Guo 等^[7]则发现 miR - 96 通过靶向调控 RECK (reversion - inducing - cysteine - rich protein with kazal motifs) 非小细胞肺癌细胞的增殖和运动。以上研究提示, miR - 96 在肺癌的发生、发展中可能起到重要的调控作用, 深入研究 miR - 96 的作用机制不仅有助于阐明肺癌发生、发展过程, 更对后续肺癌基因治疗新靶标的开发具有重要意义。

目前对 miRNA 功能研究多采用合成的 mimics, 然而 mimics 在细胞内易降解而使实验结果不确定。

使用慢病毒载体则可避免此问题的发生。笔者选用自杀性慢病毒载体,即病毒感染目的细胞后不会再感染其他细胞,也不会利用宿主细胞产生新的病毒颗粒^[8]。其慢病毒载体系统由 GV 慢病毒载体系列, pHelper 1.0 载体和 pHelper 2.0 载体 3 质粒组成。GV 慢病毒载体中含有 HIV 的基本元件 5'LTR 和 3'LTR 以及其他辅助元件。pHelper 1.0 载体中含有 HIV 病毒的 gag 基因,编码病毒主要的结构蛋白;pol 基因,编码病毒特异性的酶;rev 基因,编码调节 gag 和 pol 基因表达的调节因子。pHepler 2.0 载体中含有单纯疱疹病毒来源的 VSV-G 基因,提供病毒包装所需要的包膜蛋白。

另外,笔者构建的载体选用的 pEGFP 质粒为携带增强型绿色荧光蛋白的原核、真核双重表达的穿梭载体以利于在细胞转染时实时观察转染效率。笔者用 T 载体转化连接的方式直接将 miR-96 的反义序列连接到经酶切、纯化的 GV280 载体,转化至 Top10 感受态细胞中,分别经菌液 PCR 以及测序验证,结果表明成功构建 hsa-miR-96-5p down 慢病毒载体。同时,笔者应用荧光法和药筛法确定的病毒效价为 3×10^8 TU/ml,这为后续应用该病毒进行 miR-96 在肺癌中的生物学行为及其机制奠定了基础。

参考文献

- 1 Zhu W, Liu X, He J, *et al.* Overexpression of members of the microRNA-183 family is a risk factor for lung cancer: a case control study[J]. BMC Cancer, 2011, 11: 393
- 2 Matamala N, Vargas MT, Gonzalez-Campora R, *et al.* Tumor microRNA expression profiling identifies circulating microRNAs for early breast cancer detection[J]. Clin Chem, 2015, 61(8): 1098-1106
- 3 Zhang W, Qian P, Zhang X, *et al.* Autocrine/paracrine human growth hormone-stimulated microRNA 96-182-183 cluster promotes epithelial-mesenchymal transition and invasion in breast cancer[J]. J Biol Chem, 2015, 290(22): 13812-13829
- 4 Zhang Q, Ren W, Huang B, *et al.* MicroRNA-183/182/96 cooperatively regulates the proliferation of colon cancer cells[J]. Mol Med Rep, 2015, 12(1): 668-674
- 5 Li J, Li P, Chen T, *et al.* Expression of microRNA-96 and its potential functions by targeting FOXO3 in non-small cell lung cancer[J]. Tumour Biol, 2015, 36(2): 685-692
- 6 Guo Z, Zhao C, Wang Z. MicroRNAs as ideal biomarkers for the diagnosis of lung cancer[J]. Tumour Biol, 2014, 35(10): 10395-13407
- 7 Guo H, Li Q, Li W, *et al.* MiR-96 downregulates RECK to promote growth and motility of non-small cell lung cancer cells[J]. Mol Cell Biochem, 2014, 390(1-2): 155-160
- 8 Vijaykumar TS, Nath A, Chauhan A. Chloroquine mediated molecular tuning of astrocytes for enhanced permissiveness to HIV infection[J]. Virology, 2008, 381(1): 1-5 (收稿日期: 2015-11-04)
(修回日期: 2015-12-07)

彩超引导下小针刀治疗成人手指屈肌腱狭窄性腱鞘炎的临床研究

翁科迪 张新根 石 钢 曹 铨 孙贤杰 刘剑锋

摘 要 **目的** 探讨彩超引导下小针刀治疗成人手指屈肌腱狭窄性腱鞘炎的临床疗效。**方法** 60 例成人手指屈肌腱狭窄性腱鞘炎患者随机分为治疗组和对照组各 30 例,治疗组在彩超引导下小针刀治疗,对照组在传统盲视下行小针刀治疗。所有患者均定期复查随访 6 个月,评价疗效,并用疼痛视觉模拟评分法(VAS)记录两组患者治疗前、治疗后即刻、1 周、6 个月时手指活动时的疼痛评分。**结果** 60 例患者均获得随访 6 个月,治疗组小针刀治疗后即刻、1 周和 6 个月手指活动时的疼痛评分 VAS 均小于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。6 个月后治疗组的总治愈率是 83.33%,1 次操作治愈率是 73.33%,对照组的总治愈率是 53.33%,1 次操作治愈率是 43.33%,治疗组的总治愈率和 1 次操作治愈率高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 彩超引导下小针刀治疗成人手指屈肌腱狭窄性腱鞘炎能准确定位,精确治疗,减轻疼痛,提高疗效,值得临床推广。

关键词 彩超引导 小针刀 手指屈肌腱狭窄性腱鞘炎

中图分类号 R4 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.06.029

基金项目:嘉兴市科技计划项目(2014AY21053)

作者单位:314000 嘉兴,浙江省荣军医院骨科(翁科迪、张新根、石钢、曹铨、孙贤杰),超声科(刘剑锋)

通讯作者:翁科迪,电子信箱:cody3509@aliyun.com