

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.08.002

# 利用 RNAi 阻抑 hTERT 和 Bi-1 双基因表达的 RNAi 作用效果的研究\*

王会敏<sup>1</sup>, 何柯新<sup>2</sup>, 徐建华<sup>1</sup>, 尚陈宇<sup>1</sup>, 周克元<sup>3△</sup>

(1. 广东省中医院检验科, 广州 510120; 2. 广州医科大学附属脑科医院检验科, 广州 510370;

3. 广东医学院生物化学与分子生物学研究所, 广东湛江 524023)

**[摘要]** **目的** 利用 Lipofectamine™ 2000 将针对靶向人类端粒酶末端逆转录酶(hTERT)和 Bax inhibitor-1(Bi-1)基因设计并构建的质粒载体转染至 CNE-2Z 鼻咽癌细胞内, 诱导序列特异性的基因沉默, 研究其产生的 shRNA 阻抑 hTERT 和 Bi-1 基因表达的效果。**方法** 收集 CNE-2Z 细胞, 设未处理组、pEGFP-N1 组、pEGFP-N1/Lip 组, 采用流式细胞术检测 Lip 对 CNE-2Z 细胞的转染能力, RT-PCR 和 Western blot 法分析表达 shRNA 重组质粒载体对 hTERT 和 Bi-1 基因 mRNA 表达的抑制效应。**结果** 转染 CNE-2Z 细胞的质粒和 Lip 最佳组合: 质粒为 2.5 μg, Lip 为 6.25 μL。**结论** 成功构建的针对人 hTERT 和 Bi-1 基因的 shRNA 真核表达质粒能特异、有效地阻抑 hTERT 和 Bi-1 基因的表达。

**[关键词]** 人类端粒酶末端逆转录酶; bax inhibitor-1; RNA 干扰

**[中图分类号]** R739

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2015)08-1012-05

## The effect of RNA interference induced by inhibition of hTERT and Bi-1 gene expression\*

Wang Huimin<sup>1</sup>, He Kexin<sup>2</sup>, Xu Jianhua<sup>1</sup>, Shang Chenyu<sup>1</sup>, Zhou Keyuan<sup>3△</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medical, Guangzhou, Guangdong 510120, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Brain Hospital of Guangzhou Medical University, Guangdong 510370, China; 3. Institute of Biochemistry and Molecular Biology, Guangdong Medical College, Zhanjiang, Guangdong 524023, China)

**[Abstract]** **Objective** In this study, we constructed a series of recombinant plasmids carriers expressing shRNA targeting hTERT and Bi-1 gene. These recombinant plasmids carriers were transfected into CNE-2Z cell lines using Lip and continuously induced the expression of shRNAs. Furthermore, the shRNAs caused the degradation of mRNAs homologous in sequence with the target genes, which lead to a sequence-specific gene silencing. **Methods** The CNE-2Z cells was divided into untreated group, pEGFP-N1 group and pEGFP-N1/Lip group. Flow cytometry (FCM) was applied to determine the transfection efficiency. The changes of hTERT and Bi-1 gene expression were detected by Real-time RT-PCR and Western blotting. **Results** The best transfection efficiency between plasmid and Lip was 2.5 μg plasmid and 6.25 μL Lip. **Conclusion** We constructed several shRNA recombinant eukaryotic expression plasmids successfully. The recombinant plasmid can inhibit the expression of hTERT and Bi-1 gene specifically and effectively.

**[Key words]** hTERT; bax inhibitor-1; RNAi

众所周知, 鼻咽癌的发生、发展并不是由单一因素引起的, 所以, 单单沉默一个基因或沉默一个基因的某个片段不足以完全敲除所有的致病基因, 故需要对多个基因进行敲除。本研究拟将前期<sup>[1]</sup>已成功构建的靶向人类端粒酶末端逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)和 Bax inhibitor-1(Bi-1)的 siRNA 双基因表达载体转染人鼻咽癌细胞株 CNE-2Z, 以期在细胞内表达针对 hTERT 和 Bi-1 双基因的 shRNAs, 进而产生 RNAi 效应并特异地阻抑 hTERT 和 Bi-1 基因的表达。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 仪器** FluorChem SP 荧光化学发光凝胶图像分析系统购自 Alpha Innotech 公司; ABI PRISM 7300 荧光定量 PCR 仪购自 Applied Biosystems 公司; Epics-XL 型流式细胞仪购自美国 Coulter 公司; TC 2323 型 CO<sub>2</sub> 孵箱购自美国 SHELLAB 公司; Mini-PROTEIN II Electrophoresis Cell 和电泳转移槽购

自 BIO-RAD 公司。

**1.1.2 试剂** 鼻咽癌细胞株 CNE-2Z、真核细胞表达质粒 pcDNA3.1(+) 和绿色荧光蛋白表达质粒 pEGFP-N1 由广东医学院生物化学与分子生物学研究所提供; Kpn I、EcoR I、Not I 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、One Step SYBR Prime-Script™ TR-PCR Kit 购自宝生物公司; Lipofectamine™ 2000 购自 Invitrogen 公司; Western blot 相关试剂购自碧云天生物技术研究所。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 将 CNE-2Z 细胞培养于 RPMI-1640 培养液(含 10% 灭活小牛血清、1.0 × 10<sup>5</sup> U/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素), 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养至细胞长满瓶底, 弃去培养液。以 PBS 液冲洗 2 次, 加入 0.25% 胰蛋白酶消化至贴壁细胞逐渐趋于圆形时倒掉消化液, PBS 液冲洗, 加入 RPMI-1640 培养液终止消化。制成悬液, 分为 2~3 瓶, 置 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中继续培养 24 h。取对数生长期细胞以

每孔  $4.0 \times 10^6$  个细胞接种于 6 孔培养板。每孔加入 2 mL 培养基,置于 37 °C、含 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养至细胞汇合度约 95%,进行转染试验。

**1.2.2 筛选 pEGFP-N1 与 Lip 的最佳作用比例** 设未处理组、pEGFP-N1 组、pEGFP-N1/Lip 组(pEGFP-N1 质粒与 Lip 之比值分别为 1:0.5、1:1.5、1:2.5、1:3.5、1:4.5,其中 Lip 加 2.0 μL)。先将 Lip 用无抗菌药物无血清的 RPMI-1640 培养基稀释,轻摇混合,室温放置 5 min 后,加入用无抗菌药物无血清的 RPMI-1640 培养基稀释的 pEGFP-N1 质粒管中,轻摇混合,室温放置 20 min,逐滴加入已接种细胞的 6 孔板中。转染后 5 h 换为含  $1 \times 10^5$  U/L 青霉素,100 mg/L 链霉素,10% 新生小牛血清的 RPMI-1640 培养基。转染 48 h 后,用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞,用 PBS 液洗细胞 3 次。流式细胞仪上机检测,重复 3 次实验。

**1.2.3 筛选出 pEGFP-N1 与 Lip 的最佳作用浓度** 设未处理组、pEGFP-N1 与 Lip 组(pEGFP-N1 4.00 μg、Lip 10.00 μL; pEGFP-N1 3.50 μg、Lip 8.75 μL; pEGFP-N1 3.00 μg、Lip 7.50 μL; pEGFP-N1 2.50 μg、Lip 6.25 μL; pEGFP-N1 2.00 μg、Lip 5.00 μL; pEGFP-N1 1.50 μg、Lip 2.00 μL; 其中, pEGFP-N1 与 Lip 比例为 1:2.5)。转染时,用无血清无抗菌药物的 RPMI-1640 培养基稀释质粒与 Lip,处理细胞 48 h 后,用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞,用 PBS 液洗细胞 3 次。流式细胞仪上机检测,重复 3 次实验。

**1.2.4 RT-PCR 检测干扰质粒阻抑 hTERT 和 Bi-1 mRNA 表达情况** 提取 RNA 测定 A<sub>260</sub> 和 A<sub>280</sub> 并计算 RNA 含量,分装,置 -70 °C 备用。参照宝生物公司的 One Step SYBR Prime-Script™ RT-PCR Kit 说明书进行 RT-PCR 实验,各基因的引物设计, Beta actin 上游引物: 5'-TGG CAC CCA GCA CAA TGA A-3', 下游引物: 5'-CTA AGT CAT AGT CCG CCT AGA AGC A-3'; hTERT 上游引物: 5'-GAG TGT CTG GAG CAA GTT GCA AAG-3', 下游引物: 5'-CAC GAC GTA GTC CAT GTT CAC AAT C-3', 产物长度 187 bp; Bi-1 上游引物: 5'-ATC ATT GTA ACC AAT CCT GCC AGA C-3', 下游引物: 5'-AGC CTC GCT CTG TTG ATG TGA A-3', 产物长度 137 bp。按 20 μL 反应体系进行, Total RNA 2 μL, RNase Free dH<sub>2</sub>O 6 μL, 2×One Step SYBR RT-PCR Buffer III 10 μL, 上下游引物、TaKaRa Ex Taq™ HS(5 U/μL)、PrimeScript™ RT Enzyme Mix II 和 ROX Reference Dye or Dye II (50×) 各 0.4 μL, 每个样本设 3 个重复孔。反应条件见图 1, 反应结束后, 实验数据用系统自带的 SDS 软件(v 1.4) 进行分析。相对定量实验使用的分析方法为比较 Ct 值法。Ct 值表示阈值循环, 是荧光信号强度超过设置的阈值强度时所经历的循环数。因为 Ct

值与反应管中模板起始拷贝数的对数存在线性对应关系, 根据公式:  $\Delta\Delta Ct = [Ct_{hTERT/Bi-1} - Ct_{\beta-actin}]_{\text{实验组样品}} - [Ct_{hTERT/Bi-1} - Ct_{\beta-actin}]_{\text{空白组样品}}$  [2], 计算实验组样品相对于空白组样品中 hTERT 或 Bi-1 基因的表达量  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

**1.3 Western-blot 检测各重组质粒阻抑 CNE-2Z 细胞中 hTERT 和 Bi-1 蛋白表达情况** 按照碧云天生物技术研究所 Western 及 IP 细胞裂解液说明书上的步骤提取总蛋白并做蛋白定量。制备分离胶和浓缩胶, 按凝胶大于 VDF 膜大于滤纸的顺序, 凝胶侧阴极, PVDF 膜侧阳极连接好电极进行转膜。加上预冷的电转移缓冲液, 于 0 °C 冰箱中进行电转移, 恒流 90 mA, 转移 12~16 h (Bi-1) 或恒流 200 mA, 转移 0.75 h (β-actin) 或恒流 200 mA, 转移 3 h (hTERT)。取出转移好的 PVDF 膜, TBS 洗 10 min, 将 PVDF 膜转至塑料袋中, 加入封闭液室温封闭 3~5 h。再加入抗体进行抗原抗体反应。于暗室中显影并用 BandsScan 图像分析软件进行光密度积分值 (integral of optical density) 分析。以 hTERT 或 Bi-1 与 β-actin (内参照) 的光密度积分值之比作为各目的蛋白的相对含量值。

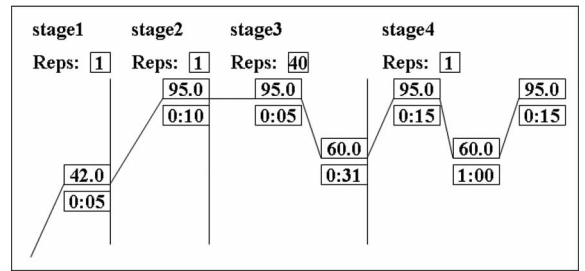


图 1 RT-PCR 反应体系

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS13.0 统计软件进行单因素方差分析和显著性检验, 结果实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 预先用 Homogeneity of Variances 进行方差齐性检验, 如方差齐采用 LDS 检验, 如方差不齐采用 Tamhane's T2 检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

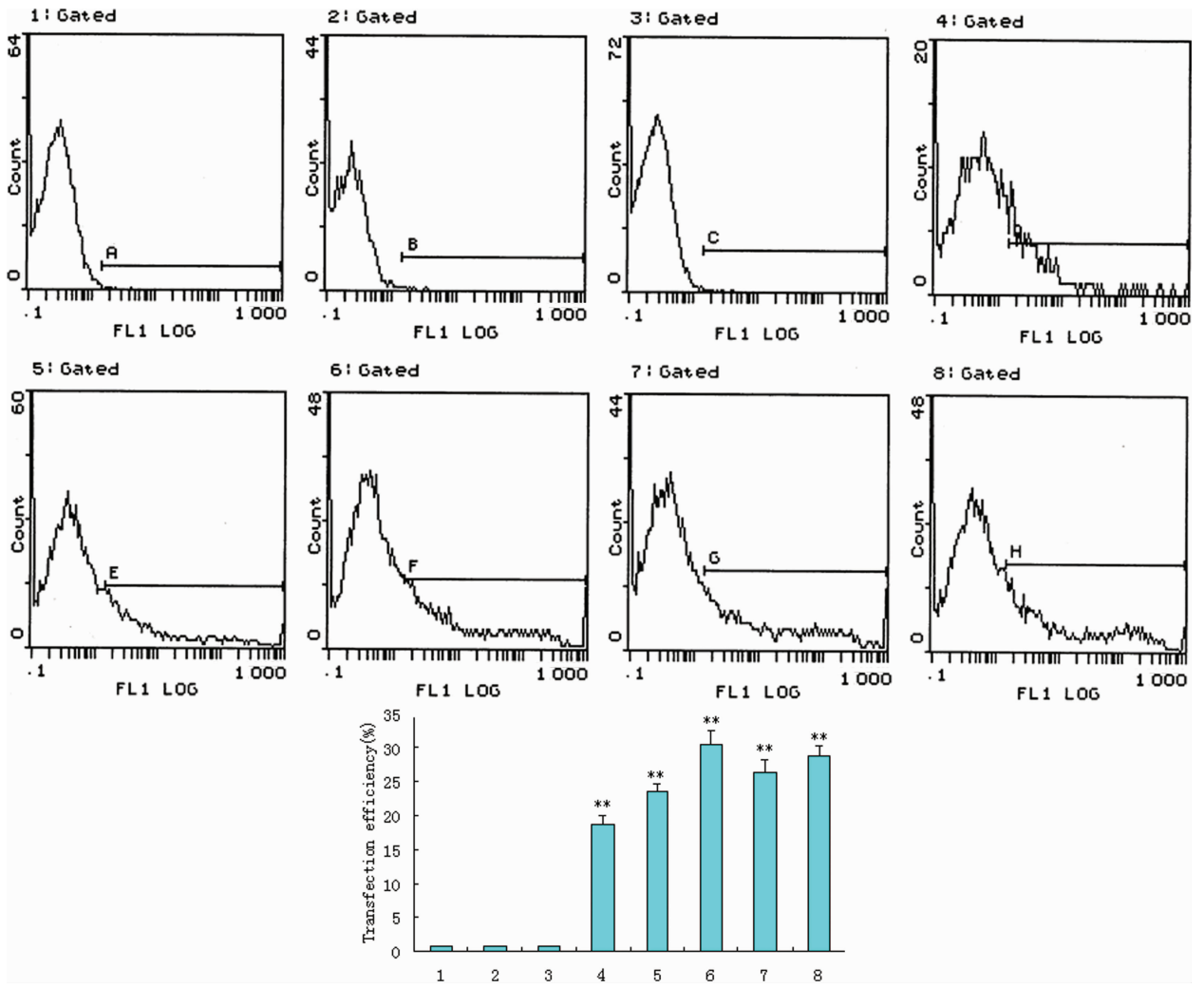
**2 结果**

**2.1 转染条件的优化** 通过流式细胞仪上机检测绿色荧光细胞的量及荧光强度, 确定最佳转染条件。FCM 结果表明, 未处理组、pEGFP-N1 组、Lip 组、EGFP-N1/Lip 组 (pEGFP-N1 质粒与 Lip 之比值分别为 1:0.5、1:1.5、1:2.5、1:3.5、1:4.5, 其中, Lip 加 2.0 μL 时), Lip 对 CNE-2Z 细胞的转染能力分别为 (0.75 ± 0.03)%, (0.81 ± 0.02)%, (0.76 ± 0.04)%, (18.6 ± 1.28)%, (23.5 ± 1.09)%, (30.4 ± 2.12)%, (26.3 ± 1.89)%, (28.7 ± 1.53)%, 结果见图 2。

表 1 各实验组 hTERT 和 Bi-1 的相对表达量 (n=3)

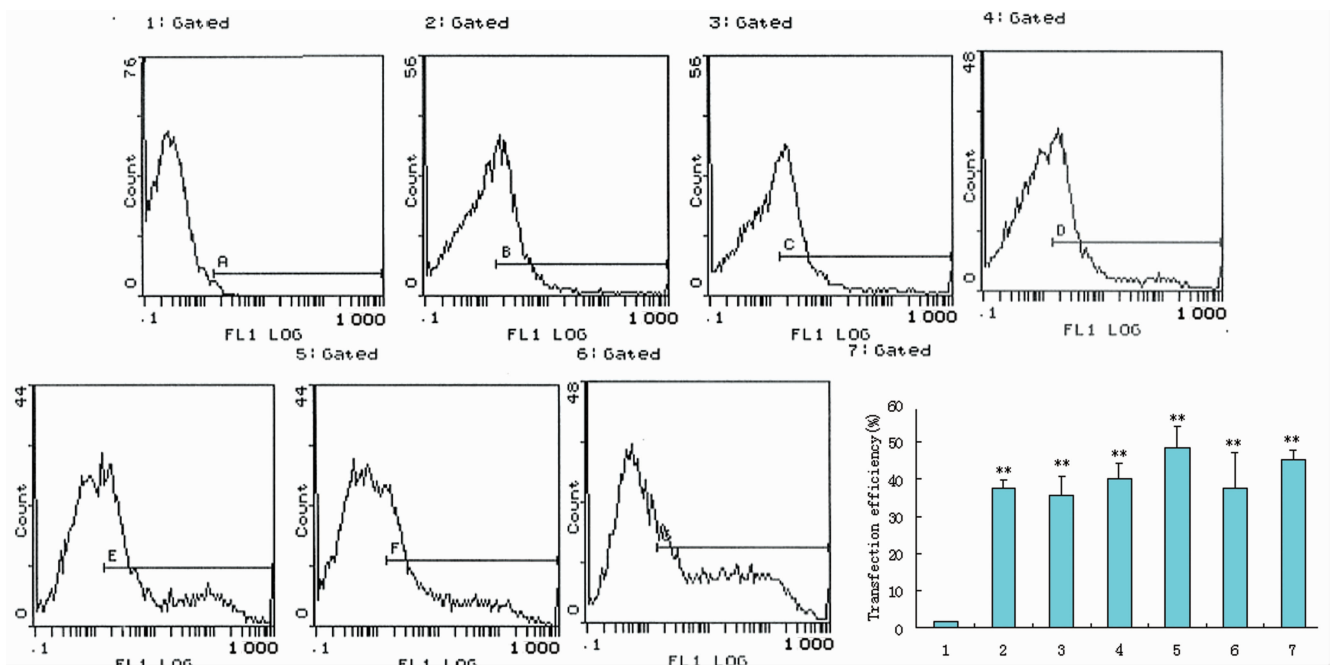
组别	平均 Ct		平均 ΔCt		ΔCt 标准差		ΔΔCt		2 <sup>-ΔΔCt</sup>		Log <sub>10</sub> 2 <sup>-ΔΔCt</sup>	
	hTERT	Bi-1	hTERT	Bi-1	hTERT	Bi-1	hTERT	Bi-1	hTERT	Bi-1	hTERT	Bi-1
untreated	24.422	24.187	10.365	9.974	0.148	0.042	0	0	1	1	0	0
Lip	24.370	24.254	10.125	10.003	0.120	0.062	-0.240	0.029	1.181	0.980	0.072	-0.009
pcDNA3.1(+)/Lip	24.422	24.248	10.258	9.908	0.122	0.063	-0.106	-0.066	1.077	1.047	0.032	0.020
TR(Bi-1)/Lip	26.047	26.069	11.506	10.996	0.048	0.078	1.142	1.023	0.453*	0.492*	-0.344	-0.038
TRs(Bi-1s)/Lip	24.283	24.380	10.207	10.050	0.092	0.058	-0.158	0.077	1.116	0.948	0.047	-0.023
TR-Bi-1/Lip	25.991	26.165	11.468	11.082	0.045	0.064	1.104	1.108	0.465*	0.464*	-0.333	-0.333
TRs-Bi-1s/Lip	24.356	24.328	10.288	9.999	0.018	0.037	-0.076	0.025	1.054	0.983	0.023	-0.007

\*: P < 0.01.



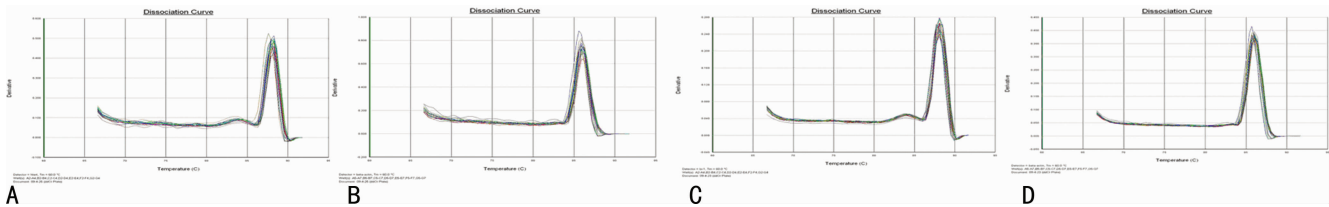
1:未处理组;2:pEGFP-N1组;3:Lip组;4:pEGFP-N1/Lip:1:0.5组;5:pEGFP-N1/Lip:1:1.5组;6:pEGFP-N1/Lip:1:2.5组;7:pEGFP-N1/Lip:1:3.5组;8:pEGFP-N1/Lip:1:4.5组。与未处理组和pEGFP-N1组比较, $n=3$ ,\*\* $P<0.01$ 。

图2 Lip介导质粒转染后CNE-2Z细胞表达GFP的情况(GFP与Lip不同比例)



1:未处理组;2:pEGFP-N1 4.00  $\mu$ g,Lip 10.00  $\mu$ L组;3:pEGFP-N1 3.50  $\mu$ g,Lip 8.75  $\mu$ L组;4:pEGFP-N1 3.00  $\mu$ g,Lip 7.50  $\mu$ L组;5:pEGFP-N1 2.50  $\mu$ g,Lip 6.25  $\mu$ L组;6:pEGFP-N1 2.00  $\mu$ g,Lip 5.00  $\mu$ L组;7:pEGFP-N1 1.50  $\mu$ g,Lip 2.00  $\mu$ L组。与未处理组和pEGFP-N1组比较, $n=3$ ,\*\* $P<0.01$ 。

图3 Lip介导质粒转染后CNE-2Z细胞表达GFP的情况(GFP与Lip不同浓度)



A: hTERT 的溶解曲线; B: 测 hTERT 时  $\beta$ -actin 的溶解曲线; C: Bi-1 的溶解曲线; D: 测 Bi-1 时  $\beta$ -actin 的溶解曲线。

图 4 RT-PCR 中 hTERT 和 Bi-1 引物的特异性

未处理组、pEGFP-N1 组与 Lip 组 (pEGFP-N1 4.00  $\mu$ g, Lip 10.00  $\mu$ L; pEGFP-N1 3.50  $\mu$ g, Lip 8.75  $\mu$ L; pEGFP-N1 3.00  $\mu$ g, Lip 7.50  $\mu$ L; pEGFP-N1 2.50  $\mu$ g, Lip 6.25  $\mu$ L; pEGFP-N1 2.00  $\mu$ g, Lip 5.00  $\mu$ L; pEGFP-N1 1.50  $\mu$ g, Lip 2.00  $\mu$ L; 其中, pEGFP-N1 与 Lip 比例为 1:2.5 时), Lip 对 CNE-2Z 细胞的转染能力分别为 (1.53 $\pm$ 0.23)%、(37.5 $\pm$ 2.20)%、(35.7 $\pm$ 5.2)%、(40.3 $\pm$ 3.89)%、(48.5 $\pm$ 5.80)%、(37.7 $\pm$ 9.20)%、(45.2 $\pm$ 2.70)%、结果见图 3。未处理组和 pEGFP-N1 对照组的绿色荧光细胞百分数及荧光强度比较差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。各经处理过的 pEGFP-N1 转染组与未处理组和 pEGFP-N1 对照组比较, 差异均有统计学意义 ( $P<0.01$ ), 其中, pEGFP-N1 为 2.5  $\mu$ g, Lip 为 6.25  $\mu$ L 时, 转染率最高, 达 48.5%, 提示 shRNA 表达质粒在 Lip 的介导下能较好地进入肿瘤细胞内。

**2.2 RT-PCR 结果** RT-PCR 反应结束后, 目的基因和内参的溶解曲线显示, 4 个曲线都只有单一的峰 (图 4), 说明所设计的引物有较高特异性, 只扩增出单一产物。设置由系统自动调整基线和阈值, 以未进行任何处理的 CNE-2Z 细胞为空白组样品, 计算出各个实验组样品相对于空白组样品的 TERT 和 (或) Bi-1 表达量 ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ), 再取其对数, 比较各实验组样品中 TERT 和 Bi-1 水平的差异。结果如表 1 所示, Lip 对照组和 pcDNA3.1(+)/Lip 对照组及乱码/Lip 组与未处理组比较, 细胞中 TERT 和 (或) Bi-1 基因的 mRNA 表达水平基本上趋于一致, 差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ); TR//Lip 组、Bi-1/Lip 组和 TR-Bi-1/Lip 组与所有对照组比较, 细胞中 TERT 和 (或) Bi-1 基因的 mRNA 表达水平显著降低, 差异有统计学意义 ( $P<0.01$ ), 前二者同后者比较, 差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。

**2.3 Western blot 实验结果** 在 CNE-2Z 细胞中, 干扰质粒 TR/Lip 组、Bi-1/Lip 组和 TR-Bi-1/Lip 组与未处理组比较, hTERT 和 (或) Bi-1 的蛋白表达水平均下调。其中, TR/Lip 组和 TR-Bi-1/Lip 组中 hTERT 蛋白的下调率分别为 67% 和 70%, Bi-1/Lip 组和 TR-Bi-1/Lip 组中 Bi-1 蛋白的下调率分别为 75% 和 69%, 提示构建的 RNA 干扰载体均能预期下调目的蛋白, 尤其是 TR-Bi-1/Lip 组, 同时下调了 hTERT 和 Bi-1 两种蛋白。

### 3 讨论

RNAi 是由双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 所引发的靶基因 mRNA 降解而导致的序列特异性基因沉默。自然界中存在着另一类 RNA 即 miRNA, 它与 siRNA 有一些相似性, 都是由大约 22 个核苷酸组成, 都能被 Dicer 所识别, 且都可发挥 RNAi 的效果, 不同的是 miRNA 被 Dicer 切割后有 2 种结果, 当 miRNA 与要沉默基因的 mRNA 完全或近乎完全配对时会裂解靶基因的 mRNA, 但是, 大多数的 miRNA 会与

mRNA 的 3' 非编码区 (3' UTR) 结合从而抑制翻译的进行<sup>[3-5]</sup>。本研究利用 miR-30 的基本骨架, 用靶基因序列代替 miR-30 的中间部分, 这样既可以使其被 Dicer 所识别, 又因其与靶基因的 mRNA 完全配对而裂解靶基因。

hTERT 定位于染色体 5p15.33, 是一个单拷贝基因, 其长度为 4 030 bp, 含有 16 个外显子和 15 个内含子, 蛋白质由 1 132 个氨基酸残基组成<sup>[6]</sup>。hTERT 被普遍认为是端粒酶的催化亚单位, 该基因的表达与人端粒酶的激活密切相关。越来越多的研究表明, 抑制端粒酶的活性可以导致肿瘤细胞生长受抑制, 最终走向凋亡<sup>[7-8]</sup>。Bi-1 是一个广泛存在于真核生物、原核生物和病毒中的保守性基因, 定位于大鼠的 7 号染色体、小鼠的 15 号染色体、人的 12 号染色体<sup>[9]</sup>。Bi-1 是近年发现的凋亡抑制因子, 主要通过抑制线粒体相关的凋亡途径阻断细胞凋亡过程<sup>[10-11]</sup>, 受 bcl-2 和 bax 的调控, 与肿瘤的发生、发展、转移和预后密切相关。

为了获得较高的转染效率和较低的非特异性效应, 本研究在确保细胞具有 95% 汇合度 (有助于减小阳离子脂质体细胞毒性对细胞的影响) 的前提下, 进行转染条件的优化。本实验构建的 RNA 干扰质粒缺乏荧光蛋白的表达构件, 无法直接检测质粒的转染率; pEGFP-N1 质粒含有绿色荧光蛋白表达构件, 且该质粒大小为 4 733 bp, 与本实验构建的 RNA 干扰质粒大小 (5 470 bp、5 501 bp 及 5 543 bp) 相近, 并且其同所构建的载体同属于含 RNA 聚合酶 II 类启动子的载体, 可作为检测干扰质粒转染效率的参考物。最终确定了转染 CNE-2Z 细胞的质粒和 Lip 最佳组合: 质粒为 2.5  $\mu$ g, Lip 为 6.25  $\mu$ L (6 孔板)。

RNAi 效率与细胞类型、转染时间、转染效率、siRNA 序列及浓度等有密切关系, 而高效转染率可增加基因表达阻抑的可能性<sup>[12-14]</sup>。本实验结果表明, Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 转染试剂具有较高的转染效率 (在 CNE-2Z 中的转染率在 40% 以上), 故选用其进行 RNAi 实验。

本实验将所构建的双基因表达载体与单基因表达载体相比较, 看其是否能同时沉默 2 种基因。RT-PCR 实验表明, 双基因沉默组中的 hTERT 和 (或) Bi-1 mRNA 的相对含量与单基因沉默组相同, 都比对照组降低, 前者同后者比较, 差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。Western blot 结果也显示双基因沉默组中的 hTERT 和 (或) Bi-1 蛋白的相对含量与单基因沉默组相同, 比对照组降低, 前者同后者比较, 差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ), 载体上的 2 个 shRNA 相互之间没有发生拮抗作用, 同时也说明了所构建的双基因表达载体的成功与有效性。

### 参考文献

- [1] 王会敏, 周克元. 靶向 hTERT 和 Bax inhibitor-1 的 siRNA 双基因表达载体的构建及鉴定 [C]. 细胞·生命·健康——第十一届中国细胞生物学学术大会暨 2009 西安

细胞生物学国际会议论文集,2009.

- [2] 林东子,张志珍,梁念慈. H9N2 亚型禽流感病毒 ns1 基因克隆[J]. 广东医学,2006,27(12):1791-1792.
- [3] Baga S,Branch J,Hunter S,et al. Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation[J]. Cell,2005,122(4):553-563.
- [4] Petersen CP,Bordeleau ME,Pelletier J,et al. Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells[J]. Molecular Cell,2006,21(4):533-542.
- [5] Jing Q,Huang S,Guth S,et al. Involvement of microRNA in AU-rich element-mediated mRNA instability[J]. Cell,2005,120(5):623-634.
- [6] Meyerson M,Counter CM,Eaton EN,et al. hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization[J]. Cell,1997,90(4):785-795.
- [7] Xiang H,Wang J,Mao YW,et al. hTERT can function with rabbit telomerase RNA; regulation of gene expression and attenuation of apoptosis[J]. Biochem Biophys Res Commun,2000,278(3):503-510.
- [8] 陈始明,陶泽璋,肖伯奎,等. 反义端粒酶催化亚单位抑制喉癌细胞生长的离体实验研究[J]. 临床耳鼻喉科杂志,2003,17(4):226-228.

- [9] Kim JG,Nonneman D,Vallet JL,et al. Linkage mapping of the porcine testis gene transcript (TEGT) gene to chromosome 5[J]. Anim Genet,2003,34(2):152-153.
- [10] Kawai-Yamada M,Saito Y,Jin L,et al. A novel Arabidopsis gene causes Bax-like lethality in Saccharomyces cerevisiae[J]. J Bio Chem,2005,280(47):39468-39473.
- [11] Westphalen BC,Wessig J,Levpoldt F,et al. BI-1 protects cells from oxygen glucose deprivation by reducing the calcium content of the endoplasmic reticulum[J]. Cell Death Differ,2005,12(3):304-306.
- [12] Ji J,Wernli M,Klimkait T,et al. Enhanced gene silencing by the application of multiple specific small interfering RNAs[J]. FEBS Letters,2003,552(2/3):247-252.
- [13] Li Y,Li M,Yao G,et al. Telomerase inhibition strategies by siRNAs against either hTR or hTERT in oral squamous cell carcinoma[J]. Cancer Gene Ther,2011,18(5):318-325.
- [14] Liang Y,Li XY,Lin RW,et al. Combinatorial gene targeting hTERT and Bi-1 in CNE-2 nasopharyngeal carcinoma cell line[J]. Biomed Rep,2013,1(2):285-293.

(收稿日期:2014-10-10 修回日期:2014-12-18)

(上接第 1011 页)  
治作用。

#### 参考文献

- [1] Ornitz DM,Marie PJ. FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease[J]. Genes Dev,2002,16(12):1446-1465.
- [2] Yin L,Du X,Li C,et al. A Pro253Arg mutation in fibroblast growth factor receptor 2 (Fgfr2) causes skeleton malformation mimicking human Apert syndrome by affecting both chondrogenesis and osteogenesis[J]. Bone,2008,42(4):631-643.
- [3] Wang Y,Xiao R,Yang F,et al. Abnormalities in cartilage and bone development in the Apert syndrome FGFR2(+/-S252W) mouse[J]. Development,2005,132(15):3537-3548.
- [4] 陈鹏,张波,张莉,等. FGFR2 持续增强对小鼠软骨成骨过程的影响[J]. 解放军医学杂志,2013,38(7):540-544.
- [5] Chen L,Li D,Li C,et al. A Ser252Trp[corrected] substitution in mouse fibroblast growth factor receptor 2 (Fgfr2) results in craniosynostosis[J]. Bone,2003,33(2):169-178.
- [6] Su N,Sun Q,Li C,et al. Gain-of-function mutation in FGFR3 in mice leads to decreased bone mass by affecting both osteoblastogenesis and osteoclastogenesis[J]. Hum Mol Genet,2010,19(7):1199-1210.
- [7] Jackson RA,Nurcombe V,Cool SM. Coordinated fibroblast growth factor and heparan sulfate regulation of os-

teogenesis[J]. Gene,2006,379:79-91.

- [8] Zhou YX,Xu X,Chen L,et al. A Pro250Arg substitution in mouse Fgfr1 causes increased expression of Cbfa1 and premature fusion of calvarial sutures[J]. Hum Mol Genet,2000,9(13):2001-2008.
- [9] Kreiborg S,Cohen MM. Characteristics of the infant Apert skull and its subsequent development[J]. J Craniofac Genet Dev Biol,1990,10(4):399-410.
- [10] Cohen MM,Kreiborg S. Suture formation,premature sutural fusion,and suture default zones in Apert syndrome[J]. Am J Med Genet,1996,62(4):339-344.
- [11] Ornitz DM. FGF signaling in the developing endochondral skeleton[J]. Cytokine Growth Factor Rev,2005,16(2):205-213.
- [12] Miraoui H,Oudina K,Petite H,et al. Fibroblast growth factor receptor 2 promotes osteogenic differentiation in mesenchymal cells via ERK1/2 and protein kinase C signaling[J]. J Biol Chem,2009,284(8):4897-4904.
- [13] 陈鹏,张波,张莉,等. FGFR2 持续增强对骨髓间充质干细胞软骨成骨影响[J]. 中华实验外科杂志,2012,29(12):2353-2356.
- [14] Raucci A,Laplantine E,Mansukhani A,et al. Activation of the ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase pathways mediates fibroblast growth factor-induced growth arrest of chondrocytes[J]. J Biol Chem,2004,279(3):1747-1756.

(收稿日期:2014-10-08 修回日期:2014-12-10)