

• 技术与方法 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.20.018

## 大鼠 shRNA-TRPC4 重组腺病毒载体的构建 及其在 EPCs 中转染效率的测定\*

林慕之<sup>1</sup>, 刘兴德<sup>2</sup>, 张璐<sup>1</sup>, 刘姿麟<sup>1</sup>, 刘志琴<sup>1</sup>, 况春燕<sup>1△</sup>

(1. 贵州医科大学附属人民医院/贵州省人民医院心内科, 贵阳 550002;

2. 贵州医科大学附属医院心内科, 贵阳 550004)

**[摘要]** **目的** 构建大鼠 shRNA-TRPC4 重组腺病毒载体并观察其在大鼠内皮祖细胞(EPCs)中的转染效率。**方法** 针对大鼠 TRPC4 序列设计 4 个 RNA 干扰靶点序列并合成双链 DNA oligo, 连接入干扰载体后转入大肠杆菌感受态细胞, 培养后挑取转化子进行 PCR 鉴定及测序比对。利用 Admax 包装系统获得重组腺病毒 Ad-shRNA-TRPC4 小量扩增并测定病毒滴度, 检测重组腺病毒对 TRPC4 表达的影响, 最后将获得的重组腺病毒转染 EPCs, 在荧光显微镜下观察并用流式细胞仪测定其转染效率。**结果** 4 组干扰质粒经培养后的转化子中均有阳性克隆, 且阳性克隆与设计的干扰靶点序列一致; 4 组目的质粒均可抑制 TRPC4 蛋白的表达, 合成的 Ad-shRNA-TRPC4 病毒滴度为  $5 \times 10^{10}$  ifu/mL; 倒置荧光显微镜和流式细胞仪检测重组腺病毒在大鼠 EPCs 的转染效率分别为  $(85.47 \pm 2.05)\%$  和  $(67.27 \pm 2.94)\%$ 。**结论** 本实验成功构建 Ad-shRNA-TRPC4 载体, 其在 EPCs 的转染效率高。

**[关键词]** 瞬时感受器电位 C 离子通道 4; shRNA; 重组腺病毒载体; 内皮祖细胞

**[中图法分类号]** R363 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)20-2709-05

### The adenovirus vector construction and transfection efficiency of TRPC4 gene in EPCs of the rats\*

LIN Muzhi<sup>1</sup>, LIU Xingde<sup>2</sup>, ZHANG Lu<sup>1</sup>, LIU Zilin<sup>1</sup>, LIU Zhiqin<sup>1</sup>, KUANG Chunyan<sup>1△</sup>

(1. Department of Cardiology, Guizhou Medical University Affiliated People's Hospital/Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang, Guizhou 550002, China;

2. Department of Cardiology, Guizhou Medical University Affiliated Hospital, Guiyang, Guizhou 550004, China)

**[Abstract]** **Objective** To construct the shRNA-TRPC4 recombinant adenovirus vector of the rats and observe its transfection efficiency in the endothelial progenitor cells (EPCs). **Methods** On the basis of the TRPC4 gene sequence of the rats, four RNA interfering target sequences were designed and the double-stranded DNA oligo of each sequence was synthesized. The DNA oligo was connected to the interfering carrier, the product was transfected into the Escherichia coli competent cells, and the transformants were identified by PCR and sequenced after cultivating. Recombinant adenovirus was constructed by using Admax system and its titer was measured, the expression of TRPC4 was detected, the obtained recombinant Ad-shRNA-TRPC4 plasmid was ultimately transfected into EPCs, observed under the fluorescence microscope and determined its transfection efficiency by flow cytometry. **Results** The positive clones existed in four interfering plasmids after culturing, and the positive clones were consistent with the designed interference target sequences; the four target plasmids could inhibit the expression of TRPC4 protein, the Ad-shRNA-TRPC4 virus titer was  $5 \times 10^{10}$  ifu/mL; the transfection efficiency was measured by inverted fluorescence microscope and flow cytometry, the ratios were respectively  $(85.47 \pm 2.05)\%$  and  $(67.27 \pm 2.94)\%$ . **Conclusion** The recombinant adenovirus vector Ad-shRNA-TRPC4 is successfully constructed, it has high transfection efficiency in EPCs.

**[Key words]** transient receptor potential canonical channel 4; shRNA; recombinant adenovirus vector; endothelial progenitor cells

冠状动脉粥样硬化性心脏病(冠心病)、高血压等疾病发病的共同环节是血管内皮的损伤和损伤后的

不良修复, 因此, 防治此类疾病的关键是尽早促进损伤血管内皮的修复。1997 年 ASAHARA 等<sup>[1]</sup>首次分

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81360034, 81560056); 贵州省留学人员科技活动择优资助项目[黔人项目资助合同(2018)0003 号]。 作者简介: 林慕之(1991—), 在读硕士, 主要从事冠状动脉粥样硬化性心脏病血管损伤和修复研究。 △ 通信作者, E-mail: xiaocky@sina.com。

表 1 DNA Oligo 片段及阴性对照

项目	5'端	STEM	Loop	STEM	3'端
shRNA-TRPC4(1)-1	CCGG	GGTGAATCTAATGGACTTTG	CTCGAG	CAAAGTCCATTAGATTCCACC	TTTTTTg
shRNA-TRPC4(1)-2	AATTCAAAAAA	GGTGAATCTAATGGACTTTG	CTCGAG	CAAAGTCCATTAGATTCCACC	
shRNA-TRPC4(2)-1	CCGG	GCTTTGGATGAGCTACTTTGA	CTCGAG	TCAAAGTAGCTCATCCAAAGC	TTTTTTg
shRNA-TRPC4(2)-2	AATTCAAAAAA	GCTTTGGATGAGCTACTTTGA	CTCGAG	TCAAAGTAGCTCATCCAAAGC	
shRNA-TRPC4(3)-1	CCGG	GCAGCATCTCTGGTCTCAATG	CTCGAG	CATTGAGACCAGGAATGCTGC	TTTTTTg
shRNA-TRPC4(3)-2	AATTCAAAAAA	GCAGCATCTCTGGTCTCAATG	CTCGAG	CATTGAGACCAGGAATGCTGC	
shRNA-TRPC4(4)-1	CCGG	GGAGGACTCAAGCATAGATTA	CTCGAG	TAATCTATGCTTGAGTCTCC	TTTTTTg
shRNA-TRPC4(4)-2	AATTCAAAAAA	GGAGGACTCAAGCATAGATTA	CTCGAG	TAATCTATGCTTGAGTCTCC	
NC-shRNA-1	CCGG	TTCTCCGAACGTGTACCGT	CTCGAG	ACGTGACACGTTCCGGAGAA	TTTTTTg
NC-shRNA-2	AATTCAAAAAA	TTCTCCGAACGTGTACCGT	CTCGAG	ACGTGACACGTTCCGGAGAA	

离出的内皮祖细胞 (endothelial progenitor cells, EPCs), 其可分化为成熟的内皮细胞从而促进血管内皮的修复<sup>[2]</sup>。瞬时感受器电位 (transient receptor potential, TRP) 通道是阳离子通道的一个超家族, 广泛分布于多种细胞, 并在功能调节中起重要作用<sup>[3]</sup>, 主要充当钙内流孔道促使胞外钙内流<sup>[4]</sup>。瞬时感受器电位 C 离子通道 (transient receptor potential canonical channel, TRPC) 是一个重要亚家族<sup>[5]</sup>。研究表明 TRPC 在平滑肌细胞中对细胞增殖和收缩功能起重要作用<sup>[6-7]</sup>。TRPC 亚家族包含 7 个成员, 分别为 TRPC1~7, 其中 TRPC4 参与血管紧张性和渗透性的调节<sup>[8]</sup>, 并可以调控血管再生<sup>[9]</sup>、内皮细胞增殖和凋亡<sup>[10]</sup>。EPCs 作为内皮细胞的前体细胞, TRPC4 是否参与其生物学功能的调节目前仍未阐明。为研究 TRPC4 对 EPCs 生物学功能的影响, 本研究构建大鼠 TRPC4 的重组腺病毒干扰质粒并观察其在 EPCs 中的转染效率, 现报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 动物和试剂** 清洁级 (170±20)g SD 大鼠购于贵州医科大学动物实验中心; pDK-CMV-GFP-U6-shRNA 载体、限制性内切酶 Age I 和 EcoR I 购于纽恩 (上海) 生物科技有限公司; HEK293 细胞购于上海和元生物技术有限公司; 大鼠组织淋巴细胞分离液购于天津灏洋生物制品科技有限公司; 小抽试剂盒购于 Promega 公司; 4 DNA ligase 和内切酶购于 NEB 公司; Taq 酶和 dNTP DH5 $\alpha$  感受态细胞、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒均购自 Takara 公司; 引物由上海英骏生物技术有限公司合成; 华大基因进行阳性克隆测序。

**1.1.2 仪器** DNA 电泳槽、稳压电泳仪 (北京六一仪器厂); 电热恒温水槽 (上海一恒科学仪器有限公司); 凝胶成像仪 (上海天能科技有限公司); 恒温培养箱 (上海精宏实验设备有限公司); 恒温摇床 (太仓市实验设备厂); PCR 仪 (Applied Biosystems 公司); 冷冻高速离心机 (Thermo 公司); 移液器 (Eppendorf 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 TRPC4 腺病毒穿梭质粒构建** 从 GenBank

中查询大鼠 TRPC4 基因 (NM\_001083115) 上下游序列设计并合成 4 对 siRNA 前体寡核苷酸片段, siTRPC4-1: GGT GGA ATC TAA TGG ACT TTG; siTRPC4-2: GCT TTG GAT GAG CTA CTT TGA; siTRPC4-3: GCA GCA TTC CTG GTC TCA ATG; siTRPC4-4: GGA GGA CTC AAG CAT AGA TTA。设阴性对照 NC 序列: TTC TCC GAA CGT GTC ACG T, 合成 DNA 双链 Oligo 片段, 见表 1。将得到的 DNA oligo 片段加水溶解至 40  $\mu$ mol/L。在退火体系中加入溶解好的正反义 DNA oligo 片段各 18  $\mu$ L, 10 $\times$ Buffer 4  $\mu$ L, 混匀后置于 95  $^{\circ}$ C 水浴, 10 min 后取出置于室温, 使之自然冷却。取 pDK-CMV-GFP-U6-shRNA 载体经 Age I 和 EcoR I 酶切使载体线性化。然后将双链 DNA 连接入酶切载体后转化入大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 于恒温培养箱中培养 16 h。

**1.2.2 PCR 阳性克隆鉴定及测序对比** 挑取平板上长出的转化子进行菌落 PCR 鉴定。正向引物: 5'-CCT ATT TCC CAT GAT TCC TTC ATA-3', 反向引物: 5'-GTA ATA CGG TTA TCC ACG CG-3'。将菌落鉴定得到的阳性克隆进行测序验证, 通过 Chromas 测序软件分析设计的 4 对穿梭质粒是否与设计的 4 对干扰靶点序列一致。

**1.2.3 腺病毒包装** 利用 Admax 系统, 选取目的穿梭质粒 shRNA-TRPC4(1) 与腺病毒骨架质粒共转染到 HEK293 细胞中获得重组腺病毒。将 HEK293 细胞接种到 6 孔板中, 控制细胞转染时的密度为 70%~80%。转染前 1 h 去除原有细胞培养基, 加入 1.5 mL 的 Opti-MEM 培养基。将待转染的病毒载体质粒 4  $\mu$ g (骨架质粒: 穿梭质粒=1:1) 溶于 Opti-MEM 培养基, 总体积为 250  $\mu$ L, 混匀。将 8  $\mu$ L 和腺病毒包装转染试剂溶于 Opti-MEM 培养基, 总体积为 250  $\mu$ L, 混匀。将腺病毒包装转染试剂稀释液滴加到质粒稀释液中, 边加边轻轻混匀, 室温静置 20 min, 使 DNA 和转染试剂充分结合形成稳定的转染复合物。将配好的 DNA-转染试剂复合物加入到细胞培养板中。6 h 后吸去培养基, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗 1 次, 加入 2 mL 新鲜完全培养基培养。每 72 小时补液 1 次, 约 7~15 d 病毒空斑出现, 完全病变后, 收集上清液。经包装后的 shRNA-TRPC4 腺病毒质粒命名为 Ad-

shRNA-TRPC4。

**1.2.4 腺病毒扩增** 将 HEK293 细胞铺在 10 cm 培养皿中,待细胞长到 90% 以上汇合度,加入合适滴度的病毒 1 000  $\mu$ L,感染细胞,待 5~6 d 全部病变后,收取病毒,并反复冻融细胞 3 次,分装。

**1.2.5 病毒滴度测定** 选取状态良好的 HEK293 细胞,接种至 24 孔板中,每孔种入  $5.0 \times 10^5$  个细胞后常规培养。依次将  $10^{-5}$  至  $10^{-8}$  稀释的病毒液加入 24 孔板中,每孔加入 100  $\mu$ L,感染 48 h。经免疫组织化学后,在 24 孔板每孔选择 5 个视野,在光学显微镜 10 $\times$  物镜下观察并计数阳性细胞个数,计算每个孔阳性细胞平均个数及病毒滴度。根据公式病毒滴度 (ifu/mL) = (平均视野阳性细胞个数  $\times$  每孔视野的个数  $\times$  稀释倍数) / 0.1 mL 可计算病毒滴度。

**1.2.6 Western blot 检测 Ad-shRNA-TRPC4 有效靶点干扰情况** 因 TRPC4 过表达腺病毒载体包含有 Flag 基因,因此将 293T 细胞接种 24 孔板后,用过表达腺病毒载体和各组干扰质粒共转染,48 h 后收集细胞提取蛋白样品,用 Western blot 鉴定已构建的 Ad-shRNA-TRPC4 是否有效减弱 Flag 基因的蛋白水平。

**1.2.7 大鼠 EPCs 的培养** 参照文献[11],使用密度梯度离心法分离大鼠骨髓单个核细胞并加入 Hyclone 的含 20% 胎牛血清及双抗的 DMEM-L 培养基培养,48 h 换液,细胞贴壁生长待密度长至 70% 时备用。

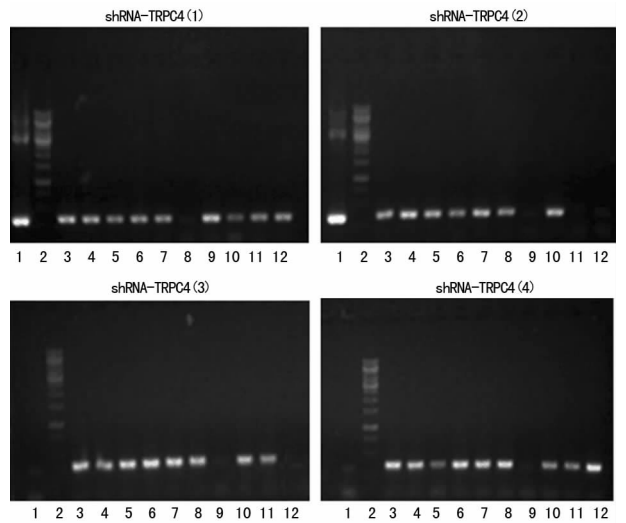
**1.2.8 Ad-shRNA-TRPC4 质粒转染 EPCs** 转染前将 EPCs 密度调整至 70% 左右,先用基础培养液将细胞换液 3 次,然后用不含血清和双抗的 DMEM-L 培养液将 Ad-shRNA-TRPC4 的病毒液稀释后进行转染。4 h 后加入新鲜的含 20% 胎牛血清及双抗的 DMEM-L 培养基,48 h 可在荧光倒置显微镜下观察细胞转染状况并照相,观察绿色荧光的细胞占所有细胞的百分比,计算出细胞转染效率,转染效率 = 视野可见的绿色荧光细胞数 / 总细胞数  $\times$  100%。因 Ad-shRNA-TRPC4 带绿色荧光蛋白(GFP),用流式细胞仪检测带 GFP 的细胞(即示转染上 Ad-shRNA-TRPC4 的细胞)所占比例。

**2 结果**

**2.1 PCR 阳性克隆鉴定** 用 PCR 鉴定 4 组干扰质粒,每组培养后挑取 10 个转化子,shRNA-TRPC4(1) 组 1~5、7~10 号转化子为阳性克隆,shRNA-TRPC4(2) 组 1~6、8 号转化子为阳性克隆,shRNA-TRPC4(3) 组 1~6、8~9 号转化子为阳性克隆,shRNA-TRPC4(4) 组 1~6、8~10 号转化子为阳性克隆。阳性克隆得到 343 bp 的片段,阴性对照条带得到 307 bp 的片段,见图 1。

**2.2 RNA 干扰(RNA interference, RNAi) 测序验证** 挑取阳性克隆进行测序,通过测序软件 Chromas 分析,所插入的 4 对 shRNA 与设计序列完全一致,说明 4 对目的穿梭质粒 shRNA-TRPC4(1)、shRNA-TRPC4(2)、shRNA-TRPC4(3)、shRNA-TRPC4(4)

构建成功,见图 2。



1: 阴性对照(空载体质粒); 2: DNA Marker, 从上到下的方向依次为 2 000、1 000、750、500、250、100 bp; 3~12: 挑取的 10 个转化子

图 1 菌落 PCR 鉴定

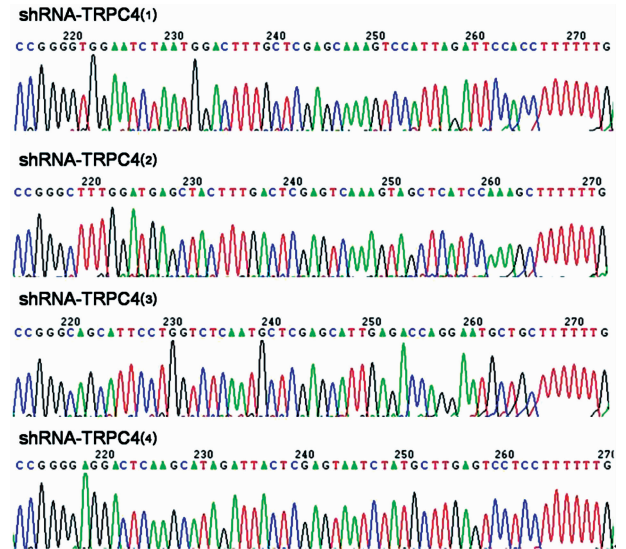


图 2 shRNA-TRPC4 穿梭质粒测序结果

**2.3 病毒包装** 选取测序正确的 shRNA-TRPC4(1) 和骨架质粒共转染 HEK293 细胞,转染 11 d 后观察,HEK293 细胞已大量飘落,细胞基本呈绿色,此时可收集细胞进行病毒贮藏,获得 TRPC4 重组腺病毒载体 Ad-shRNA-TRPC4,见图 3。

**2.4 病毒滴度** 显微镜下 5 个视野中计算的阳性细胞平均数为 7 个,此孔病毒稀释了  $10^7$  倍,得出病毒滴度为  $5 \times 10^{10}$  ifu/mL。

**2.5 各质粒转染 293T 细胞的 Flag 基因的表达** shRNA-TRPC4(1)、shRNA-TRPC4(2)、shRNA-TRPC4(3)、shRNA-TRPC4(4) 组 Flag 蛋白的表达与对照组 TRPC4 过表达腺病毒载体组比较完全缺如,说明 shRNA-TRPC4(1)、shRNA-TRPC4(2)、shRNA-TRPC4(3)、shRNA-TRPC4(4) 明显抑制 293T 细胞中 TRPC4 基因的表达。

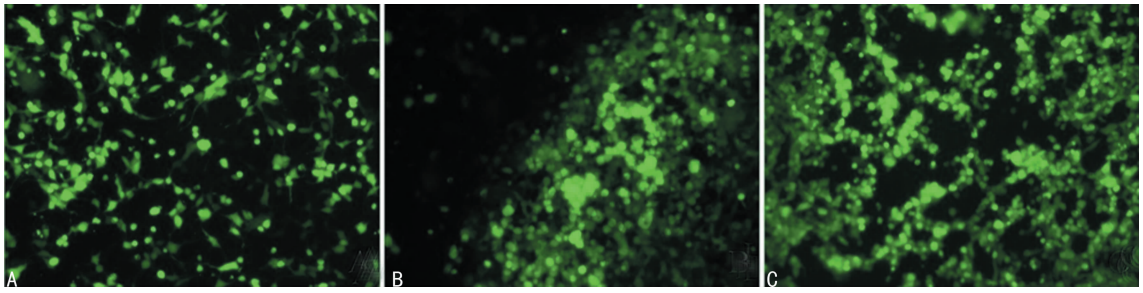


图 3 荧光显微镜下转染后的 HEK293 细胞( $\times 100$ )

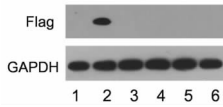


图 4 Flag 在 293T 细胞中的表达

1: 293T 阴性对照细胞样品; 2: TRPC4 过表达腺病毒载体转染 293T 样品; 3~6: shRNA-TRPC4(1)、(2)、(3)、(4) 分别与 TRPC4 过表达腺病毒载体共转染 293T 细胞样品

**2.6 Ad-shRNA-TRPC4 转染 EPCs** 用 Ad-shRNA-TRPC4(1) 转染 EPCs 48 h 后, 在倒置荧光显微镜下观察, 转染效率为  $(85.47 \pm 2.05)\%$ , 见图 5。用流式细胞仪测定带 GFP 的细胞占总细胞的比值, Ad-shRNA-TRPC4 转染 EPCs 效率为  $(67.27 \pm 2.94)\%$ , 见图 6。

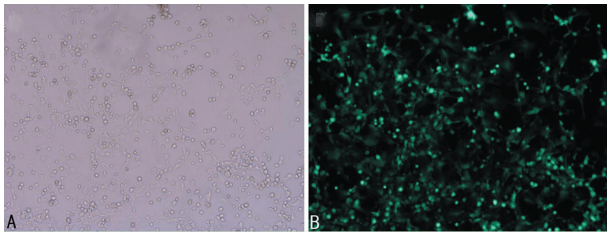


图 5 Ad-shRNA-TRPC4 转染 EPCs 的代表图( $\times 100$ )

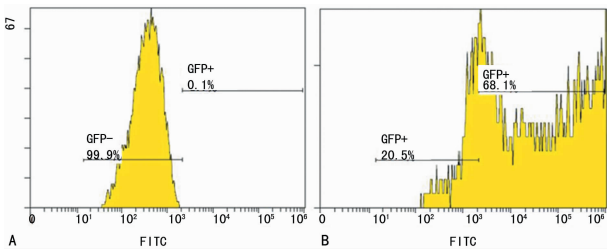


图 6 流式细胞仪测定带 GFP 的 EPCs 细胞水平的代表图

### 3 讨论

本研究有两个重要成果: (1) 成功构建 TRPC4 的 shRNA 质粒, 并进行腺病毒包装, 为后续的细胞实验及动物模型实验提供研究基础; (2) 用构建的 Ad-shRNA-TRPC4 成功转染体外培养的 EPCs, 并得到高效率的转染, 为后续实验提供保障。

血管内皮损伤是动脉粥样硬化、高血压等疾病发病的共同环节。血管损伤时, EPCs 可从骨髓激活并特异性迁移至损伤血管部位, 分化为成熟的内皮细

胞, 促进损伤血管内皮的修复<sup>[12]</sup>。钙离子是细胞重要的第二信使, 参与了细胞的增殖、分化、迁移和细胞因子分泌等多种功能的调控<sup>[13]</sup>, 而 TRP 通道则参与了作为胞外钙内流途径之一的钙库操纵性钙通道孔径的构成。最新研究表明, TRPC4 作为 TRP 通道的重要成员之一, 在心血管系统疾病的发生、发展中发挥了重要作用<sup>[14]</sup>, TRPC4 对内皮细胞的功能有重要影响<sup>[15]</sup>, 但 TRPC4 对内皮细胞的前体细胞 EPCs 是否有生物学功能影响目前仍不清楚。为完成上述研究, 本课题组需沉默 TRPC4 基因在 EPCs 的表达, 观察其对 EPCs 生物学行为影响。目前用于沉默基因表达的常用方法如下: (1) 复制基因敲除的动物; (2) 构建基因干扰质粒包括 siRNA 和 shRNA 干扰质粒。本研究通过 RNAi 的方法构建沉默大鼠 TRPC4 基因表达的重组腺病毒载体。RNAi 是由内、外源性双链 RNA 介导的多步骤、多因子参与的过程, 可使细胞内 mRNA 发生特异性降解, 导致目的基因有效沉默或抑制<sup>[16]</sup>。研究表明, siRNA 介导的 RNAi 干扰靶基因表达的效率低, 而 shRNA 介导的 RNAi 可以稳定地抑制目的基因的表达, 且比化学合成 siRNA 有更低的成本。目前用于包装质粒的病毒有慢病毒、腺病毒、腺相关病毒及反转录病毒, 本实验选择腺病毒作为病毒载体, 该病毒宿主范围广, 基因组信息清楚, 易操作, 容易获得高滴度, 瞬间表达, 安全性较高, 可感染多种人类细胞。目前较为成熟的载体系统有非复制型(如 AdMax) 和复制型(又叫溶瘤腺病毒) 两种。本课题组选择 Admax 包装系统, 此系统主要利用 Cre/loxP(或 FLP/frt) 重组酶将携带外源基因的穿梭质粒与骨架质粒在 HEK293 细胞中重组, 产生重组腺病毒<sup>[17]</sup>。

综上所述, 本实验成功构建了 shRNA-TRPC4 重组病毒载体, 实现了高效干扰 EPCs 中 TRPC4 表达的目的, 为后续研究基因沉默大鼠 TRPC4 表达对 EPCs 的生物学功能有何影响奠定了基础, 有助于进一步探索血管损伤后内皮的再生机制。

### 参考文献

- [1] ASAHARA T, MUROHARA T, SULLIVAN A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis[J]. Science, 1997, 275(532): 964-967.

- [2] MINHAJAT R, NILASARI D, BAKRI S. The role of endothelial progenitor cell in cardiovascular disease risk factors[J]. *Acta Med Indones*, 2015, 47(4):340-347.
- [3] ANTIGNY F, SABOURIN J, SAÛC S, et al. TRPC1 and TRPC4 channels functionally interact with STIM1L to promote myogenesis and maintain fast repetitive  $Ca^{2+}$  release in human myotubes [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2017, 1864(5):806-813.
- [4] TAKAHASHI N, KOZAI D, MORI Y. TRP channels: sensors and transducers of gasotransmitter signals[J]. *Front Physiol*, 2012, 3:324.
- [5] MOLNÁR T, YARISHKIN O, IUSO A, et al. Store-operated calcium entry in müller glia is controlled by synergistic activation of TRPC and orai channels[J]. *J Neurosci*, 2016, 36(11):3184-3198.
- [6] JIANG H N, ZENG B, CHEN G L, et al. Lipopolysaccharide potentiates endothelin-1-induced proliferation of pulmonary arterial smooth muscle cells by upregulating TRPC channels[J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 82:20-27.
- [7] LIU X R, ZHANG M F, YANG N, et al. Enhanced store-operated  $Ca^{2+}$  entry and TRPC channel expression in pulmonary arteries of monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2012, 302(1):C77-87.
- [8] FREICHEL M, TSVILOVSKYY V, CAMACHO-LONDOÑO J E. TRPC4- and TRPC4-containing channels[J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2014, 222:85-128.
- [9] ROSENBAUM M A, CHAUDHURI P, GRAHAM L M. Hypercholesterolemia inhibits re-endothelialization of arterial injuries by TRPC channel activation [J]. *J Vasc Surg*, 2015, 62(4):1040-1047.
- [10] SONG H B, JUN H O, KIM J H, et al. Suppression of transient receptor potential canonical channel 4 inhibits vascular endothelial growth factor-induced retinal neovascularization[J]. *Cell Calcium*, 2015, 57(2):101-108.
- [11] KUANG C Y, YANG T H, ZHANG Y, et al. Schlafen 1 inhibits the proliferation and tube formation of endothelial progenitor cells[J]. *PLoS One*, 2014, 9(10):e109711.
- [12] WANG X, YU Y, LI M, et al. EPCs enhance angiogenesis in renal regeneration[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(29):44941-44949.
- [13] DITTMER P J, WILD A R, DELL'ACQUA M L, et al. STIM1  $Ca^{2+}$  sensor control of I-type  $Ca^{2+}$ -channel-dependent dendritic spine structural plasticity and nuclear signaling[J]. *Cell Rep*, 2017, 19(2):321-334.
- [14] CAMACHO LONDOÑO J E, TIAN Q, HAMMER K, et al. A background  $Ca^{2+}$  entry pathway mediated by TRPC1/TRPC4 is critical for development of pathological cardiac remodelling[J]. *Eur Heart J*, 2015, 36(33):2257-2266.
- [15] FRANCIS M, XU N, ZHOU C, et al. Transient receptor potential channel 4 encodes a vascular permeability defect and high-frequency  $Ca^{2+}$  transients in severe pulmonary arterial hypertension [J]. *Am J Pathol*, 2016, 186(6):1701-1709.
- [16] HUANG Y, YE Y, LONG P, et al. Silencing of CXCR4 and CXCR7 expression by RNA interference suppresses human endometrial carcinoma growth in vivo[J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(4):1896-1904.
- [17] PENG Y F, SHI Y H, DING Z B, et al.  $\alpha$ -Fetoprotein promoter-driven Cre/LoxP-switched RNA interference for hepatocellular carcinoma tissue-specific target therapy [J]. *PLoS One*, 2013, 8(2):e53072.

(收稿日期:2017-12-18 修回日期:2018-03-11)

(上接第 2708 页)

- fracture[J]. *Chin J Traumatol*, 2010, 13(4):212-216.
- [5] 陈永龙, 张怡五, 王晓勇, 等. 人工髋关节置换术治疗高龄不稳定股骨粗隆间骨折 34 例疗效分析[J]. *重庆医学*, 2013, 42(8):934-936.
- [6] 王刊石, 赵磊, 周超, 等. 股骨近端锁定钢板置入修复老年稳定性股骨转子间骨折: 疗效及并发症评估[J]. *中国组织工程研究*, 2015, 19(26):4208-4212.
- [7] 刘建斌, 刘敏, 马林, 等. 防旋髓内钉和 InterTan 固定 A3 型股骨转子间骨折: 生物力学变化的有限元分析[J]. *中国组织工程研究*, 2015, 19(26):4242-4246.
- [8] 张立智, 胡孙君, 杜守超, 等. 股骨头内螺旋刀片与拉力螺钉的特点对比和生物力学的研究进展[J]. *中国临床解剖学杂志*, 2015, 33(5):608-611.
- [9] YU J, ZHANG C, LI L, KWONG JS, et al. Internal fixation treatments for intertrochanteric fracture: a systematic review and meta-analysis of randomized evidence[J]. *Sci Rep*, 2015, 5:18195.
- [10] 胡炳炎, 艾金伟, 陈琼, 等. 系统评价和 Meta 分析股骨近端髓内钉与防旋型股骨近端髓内钉治疗股骨转子间骨折的差异[J]. *中国组织工程研究*, 2016, 20(53):8010-8021.
- [11] 乔永杰, 曹雪飞, 张吕丹, 等. 防旋髓内钉、动力髋螺钉及全髋关节置换修复老年股骨转子间骨折的 Meta 分析[J]. *中国组织工程研究*, 2015, 19(31):5057-5064.
- [12] UNNANUNTANA A, GOODMAN S B. Conversion total hip replacement after malunited intertrochanteric fracture: a technical note[J]. *Am J Orthop (Belle Mead NJ)*, 2008, 37(10):506-509.
- [13] 张飞, 彭吾训. 髋关节置换术在治疗老年股骨转子间骨折中的应用现状[J]. *实用医学杂志*, 2016, 32(21):3486-3488.
- [14] 成世高, 王万春, 肖扬, 等. 骨水泥型人工股骨头置换治疗高龄不稳定型股骨转子间骨折[J]. *中国组织工程研究*, 2015, 19(52):8373-8378.

(收稿日期:2017-12-26 修回日期:2018-03-21)