

论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2021.08.004

网络首发 <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20210406.1518.003.html>(2021-04-06)

大鼠 shRNA-Slfn5 重组腺病毒载体的构建及其在 EPCs 中的转染效率*

李玉珠^{1,2}, 况春燕^{2△}

(1. 贵州大学医学院, 贵阳 550025; 2. 贵州省人民医院心内科, 贵阳 550002)

[摘要] **目的** 构建大鼠 shRNA-Slfn5 重组腺病毒载体并观察在内皮祖细胞(EPCs)中的转染效率。**方法** 根据 Rat Slfn5 基因的 mRNA 序列设计合成 siRNA 片段 5 个, 分别克隆到 pDKD-CMV-U6-shRNA 上转入大肠杆菌感受态细胞, PCR 筛选转化子, 阳性克隆进行测序; 利用 Admax 系统选取目的穿梭质粒 shRNA-Slfn5(5)包装和扩增重组腺病毒 shRNA-Slfn5 及病毒滴度测定; 利用 Slfn5 过表达腺病毒质粒中目的基因携带 Flag 标签, 通过 Western blot 法检测 Slfn5 过表达腺病毒质粒与靶点质粒共转染 293T 细胞中 Flag 表达, 观察靶点质粒对 Slfn5 表达的影响; 最后用病毒感染 EPCs 并用绿色荧光蛋白量检测转染效率。**结果** 经测序验证 5 组目的质粒构建成功; 重组腺病毒质粒 shRNA-Slfn5(1)、shRNA-Slfn5(4)、shRNA-Slfn5(5)可明显抑制 Flag 蛋白的表达; shRNA-Slfn5 病毒滴度为 3.95×10^{10} PFU/mL; EPCs 的转染效率为 $(85.64 \pm 2.58)\%$ 。**结论** 构建了 shRNA-Slfn5 重组腺病毒载体, 其在 EPCs 转染效率高。

[关键词] Schlafen5; 内皮祖细胞; shRNA

[中图法分类号] R363 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2021)08-1277-07

Construction of recombinant adenovirus vector carrying rat shRNA-Slfn5 gene and its transfection efficiency in EPCs*

LI Yuzhu^{1,2}, KUANG Chunyan^{2△}

(1. School of Medicine, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025, China;

2. Department of Cardiology, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang, Guizhou 550002, China)

[Abstract] **Objective** To construct the recombinant adenovirus vector carrying rat shRNA-Slfn5 gene expression system and to observe its transfection efficiency in the endothelial progenitor cells (EPCs). **Methods** Five fragments of siRNA were designed and synthesized according to the Rat Slfn5 gene mRNA sequence, separately cloned into the plasmid vector pDKD-CMV-U6-shRNA and shifted into E. coli competent cell, PCR was used to screen the transgenes, and the sequencing was performed by positive clones. The Admax system was used to select the objective shuttle plasmid shRNA-Slfn5(5) for packaging and amplifying recombinant adenovirus shRNA-Slfn5 and conducting the virus titers detection; the Slfn5 was overexpressed the target gene in adenovirus plasmid and carried the Flag label. The Flag expression in the 293T cells co-transfected by the Slfn5 overexpression adenovirus plasmid and the target plasmid was detected by Western blot. The influence of target plasmid on Slfn5 expression was observed; finally the virus was used to infect EPCs and the transfection efficiency was detected by the green fluorescence protein quantity. **Results** The sequencing verified that the 5 groups of target plasmids were successfully constructed. The recombinant adenovirus plasmid shRNA-Slfn5(1), shRNA-Slfn5(4) and shRNA-Slfn5(5) could significantly inhibit the Flag protein expression; the shRNA-Slfn5 virus titers was 3.95×10^{10} pfu/mL, the EPCs transfection rate was $(85.64 \pm 2.58)\%$. **Conclusion** The shRNA-Slfn5 recombinant adenovirus vector is successfully constructed. It has high efficiency in EPCs.

[Key words] Schlafen5; endothelial progenitor cells; shRNA

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81560056); 贵州省第十二批优秀青年科技人才项目(黔科合平台人才[2019]5662); 贵州省科技计划项目(黔科合基础[2018]1097); 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]003号); 贵州省科技平台及人才团队计划项目(黔科合平台人才2017-5405)。 作者简介: 李玉珠(1995—), 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以及生物信息学分析。 △ 通信作者, E-mail: xiaoke@ sina. com。

血管内皮损伤被认为是动脉粥样硬化的触发因素和关键因素。以往研究表明,来自骨髓或脾脏的内皮祖细胞(EPCs)有可能被整合到损伤区域并分化为内皮细胞(ECs),从而有助于改善内皮功能^[1]。Schlafen(Slfn)基因家族包含 10 种鼠源基因(Slfn 1, 1L, 2, 3, 4, 5, 8, 9, 10 和 14), 5 种人类 Slfn 蛋白(SLFN5, 11, 12, 13 和 14)^[2-5]。Slfn5 基因由 1 个 AAA 结构域、1 个独特的 SLFN 盒及 1 个预测的具有螺旋-转-螺旋结构域的转录调节区组成^[6]。Slfn5 是肾细胞癌(RCC)患者的较好生存标志,敲除 RCC 中的 Slfn5 会导致癌细胞显著增加。据报道,Slfn5 可以调节涉及 RCC 迁移的基质金属蛋白酶(MMP)基因的表达,例如 MMP-1 和 MMP-13^[6-7]。由此可见,Slfn5 是一个具有极其重要功能的蛋白,对其进一步研究有着重要的意义。然而,Slfn5 是否可以调控心血管系统,对 EPCs 增殖及其迁移的影响及机制迄今为止尚未研究。为探讨 Slfn5 基因对 EPCs 生物学行为的影响,本研究构建了 shRNA-Slfn5 重组腺病毒用于感染 EPCs 并观察其在 EPCs 中的转染效率,现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料来源

大鼠原代 EPCs(上海庚运生物科技有限公司)、HEK293 细胞(上海和元生物技术有限公司)、大肠杆菌 DH5 α 株、测序引物(华大基因)、TaqDNA 聚合酶、dNTP、pDKD-CMV-eGFP-U6-shRNA 载体、AxyPrep 质粒 DNA 小量试剂盒、无缝克隆试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒、PrimescriptTMRT 试剂盒、T4DNA 连接酶、限制性内切酶 Age I、EcoR I、抗生素(氨苄青霉素、卡那霉素)、DMEM 培养基、LB 培养基、限制性内切酶和限制性内切酶缓冲液(10 $\times$)、乙酰化低密度脂蛋白(DiI-AC-LDL,美国 Invitrogen 公司)、多聚甲醛(PFA 细胞芯片生物技术,中国深圳)、荆豆凝集素 I (FITC-UEA-I, 美国 Sigma-Aldrich 公司)。

1.2 干扰载体的构建

1.2.1 干扰靶点的设计和引物合成

采用美国 VectorNTI 软件,针对大鼠 Slfn5 基因(GenBank Gene ID:XM_220775.7)的 mRNA 序列设计了 5 条 siRNR 序列及 1 条无义的阴性对照(NC)序列见表 1。人工合成上述 6 对引物,在正向引物和反向引物的 5'末端分别加入 Age I 和 EcoR I 的限制性位点,中间含发卡环(loop)序列(表 2)。

1.2.2 目的穿梭质粒的构建与鉴定

载体 pDKD-CMV-eGFP-U6-shRNAs 用 Age I

和 EcoR I 消化使其线性化,通过在 22 $^{\circ}\text{C}$ 下用 T4DNA 连接酶处理 4 h。将聚合酶链反应片段插入纯化的穿梭载体中。将产物转化为 DH5 α 感受态细胞,并将细胞在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下在卡那霉素抗性平板上孵育过夜。从平板中选择单个菌落,并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的液体培养基中振荡(300 r/min)传代培养过夜。按照说明书用质粒纯化试剂盒提取并纯化质粒,然后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下消化 2 h,消化后的质粒用 1%琼脂糖凝胶电泳确认。正向引物 hU6-F2: TACGATACAAGGCTGT-TAGAGAG 位于人 U6 启动子序列中,反向引物 pYSEQR:CTATTAATAACTAATGCATGGC 位于 CMV 启动子的 5'序列。将菌落鉴定得到的阳性克隆被送至华大基因进行测序。经测序验证正确的质粒命名为 shRNA-Slfn5(1)、shRNA-Slfn5(2)、shRNA-Slfn5(3)、shRNA-Slfn5(4)、shRNA-Slfn5(5)、shRNA-Slfn5(NC),最后质粒被提取。

表 1 Slfn5 基因 siRNA 序列片段

序列	靶序列	GC 碱基占比(%)
Slfn5-siRNA-1	CCTGATTCTCTGGGAGGTAA	52.6%
Slfn5-siRNA-2	GCATCATTCCTTGGTCTT	42.1%
Slfn5-siRNA-3	GGAAATGGATGCCACACAA	47.4%
Slfn5-siRNA-4	GCAACAGCATGAGTTGCTT	47.4%
Slfn5-siRNA-5	GCTGTTTGTTTCATGGTTTA	36.8%
NC	TTCTCCGAACGTGTCACGT	52.6%

1.3 重组腺病毒的包装、扩增和滴度测定

1.3.1 病毒包装和扩增

HEK293T 细胞在 37 $^{\circ}\text{C}$ 和 5% CO $_2$ 培养箱中在高糖 DMEM 培养基(美国 Hyclon 公司)中培养,该培养基含有 10%胎牛血清(Gibco)。步骤:将 HEK293 细胞接种到 6 孔板上,培养 24 h 至对数生长期,用于在 60%~80%汇合时转染;培养皿中加入 1.5 mL 不含血清的新鲜培养基,5 μg 质粒 DNA 与 10 μL Lipofectamine 2000 混合,转染到 293 细胞中;转染后 2、8、15 d,荧光显微下观察细胞形态变化。在细胞转化(具有病毒斑的扩大的圆形细胞形状)并开始分离后,轻轻刮下细胞,通过在-70 $^{\circ}\text{C}$ /37 $^{\circ}\text{C}$ 下反复冷冻和解冻 3 次进行裂解。短暂离心后,收集病毒上清液并在-20 $^{\circ}\text{C}$ 下储存。病毒上清液用于第 2 次转染 HEK293A 细胞,病毒扩增后,收集病毒上清液并浓缩。

1.3.2 腺病毒的滴度测定

将 HEK293 细胞按 5.0 $\times 10^5$ 个/孔接种 24 孔板后,培养 12 h。依次将 10 $^{-8}$ ~10 $^{-5}$ 稀释的病毒液加入 24 孔板中,每孔加入 100 μL 感染 48 h。观察细胞

培养中病毒空斑的形成,每孔随机选择 5 个视野,使用光学显微镜 10×物镜下计算阳性细胞数。计算每孔阳性细胞的平均个数和病毒滴度。病毒滴度(PFU/mL) = (平均视野阳性细胞数×每孔视野的个数×稀释倍数)/0.1 mL。

1.4 重组腺病毒的鉴定

前面构建的 Slfn5 过表达腺病毒质粒(pADV-

MCMV-Slfn5-3xFLAG-P2A-EGFP) 包含有 flag 标签,所以可以使用 Flag 抗体检测共表达与干扰质粒共转染的 293T 细胞。Western Blot 验证质粒 shRNA-Slfn5(1)、shRNA-Slfn5(2)、shRNA-Slfn5(3)、shRNA-Slfn5(4)、shRNA-Slfn5(5)对过表达病毒转染的 293T 细胞中 Slfn5 蛋白表达的干扰效果。

表 2 病毒载体构建框架

项目	5'端	STEM	Loop	STEM	3'端
Slfn5-shRNA-1-F	CCGG	CCTGATTCTCTGGGAGGTAA	TTCAAGAGA	TTACCTCCCAGGAATCAGG	TTTTTTTG
Slfn5-shRNA-1-R	AATTCAAAAAA	CCTGATTCTCTGGGAGGTAA	TCTCTTGAA	TTACCTCCCAGGAATCAGG	
Slfn5-shRNA-2-F	CCGG	GCATCATTCCTTTGGTCTT	CTCAAGAGA	AAGACCAAGGGAATGATGC	TTTTTTTG
Slfn5-shRNA-2-R	AATTCAAAAAA	GCATCATTCCTTTGGTCTT	TCTCTTGAG	AAGACCAAGGGAATGATGC	
Slfn5-shRNA-3-F	CCGG	GGAAATGGATGCCACACAA	TTCAAGAGA	TTGTGTGGCATCCATTTC	TTTTTTTG
Slfn5-shRNA-3-R	AATTCAAAAAA	GGAAATGGATGCCACACAA	TCTCTTGAA	TTGTGTGGCATCCATTTC	
Slfn5-shRNA-4-F	CCGG	GCAACAGCATGAGTTGCTT	CTCAAGAGA	AAGCAACTCATGCTGTTGC	TTTTTTTG
Slfn5-shRNA-4-R	AATTCAAAAAA	GCAACAGCATGAGTTGCTT	TCTCTTGAG	AAGCAACTCATGCTGTTGC	
Slfn5-shRNA-5-F	CCGG	GCTGTTTGTTCATGGTTTA	TTCAAGAGA	TAAACCATGAACAAACAGC	TTTTTTTG
Slfn5-shRNA-5-R	AATTCAAAAAA	GCTGTTTGTTCATGGTTTA	TCTCTTGAA	TAAACCATGAACAAACAGC	
NC-F	CCGG	TTCTCCGACGTTGTCACGT	TTCAAGAGA	ACGTGACACGTTCCGAGAA	TTTTTTTG
NC-R	AATTCAAAAAA	TTCTCCGACGTTGTCACGT	TCTCTTGAA	ACGTGACACGTTCCGAGAA	

1.5 EPCs 的鉴定与转染

鉴定 EPCs,细胞与 2.4 ng/mL 的 DiI-AC-LDL 结合,在 37 °C 下放置 1 h;并固定在 2%多聚甲醛 15 min。用 PBS 洗涤后,细胞用 10 mg/mL FITC-UEA-I 染色;样品用 PBS 漂洗 3 次,并用共聚焦显微镜拍照记录。此外,EPCs 表型通过荧光激活细胞分选术(FACS)用 5 种抗体测定。用 0.25%胰蛋白酶消化收集贴壁细胞,将之与 FITC 结合的抗体 ECs 标志物(CD31、CD34、KDR)、干细胞标志物(CD45、CD133)在 4 °C 下孵育 30 min,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤后,用 PBS 悬浮细胞进行流式细胞术检测。待 EPCs 长至大约板面积的 70%即可加入重组腺病毒转染 EPCs,在荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白的表达,计算绿色荧光细胞所占所有细胞百分比,计算细胞转染效率,转染效率=视野可见的绿色荧光细胞数/总细胞数×100%(有绿色荧光表明转染上 shRNA-Slfn5)。

2 结 果

2.1 目的穿梭质粒的鉴定

2.1.1 菌落 PCR 鉴定阳性克隆

在大肠杆菌 DH5α 中构建重组腺病毒质粒,用菌落 PCR 鉴定 5 组干扰质粒,每组选取 8 个转化子,观

察到正确的克隆大约为 332 bp 的特定条带,表明 5 个克隆是正确的(图 1)。

2.1.2 测序鉴定重组穿梭质粒

测序结果显示 shRNA-Slfn5(1)、shRNA-Slfn5(2)、shRNA-Slfn5(3)、shRNA-Slfn5(4)、shRNA-Slfn5(5)、shRNA-Slfn5(NC)重组质粒中插入的序列与预期符合(图 2),表明目的穿梭质粒构建成功。

2.2 重组腺病毒的包装及扩增

选取测序正确的 shRNA-Slfn5(5)同源重组腺病毒基因组质粒转染入 HEK293 细胞,2 d 后,在光学显微镜下观察到斑块形成、细胞变圆、肿胀和壁上裂开及其他损伤,HEK293A 细胞出现绿色荧光蛋白的表达,并且随着培养时间的延长表达增加;随着时间增加,GFP 的表达量愈多并且大多数细胞似乎表现出细胞病变效应,如肿胀、圆形、葡萄状,一些细胞漂浮;第 15 天时,HEK293 细胞大量死亡和损伤,收集毒液。病毒上清液用于第 2 次转染 HEK293A 细胞,病毒扩增。见图 3。

2.3 重组腺病毒的滴度

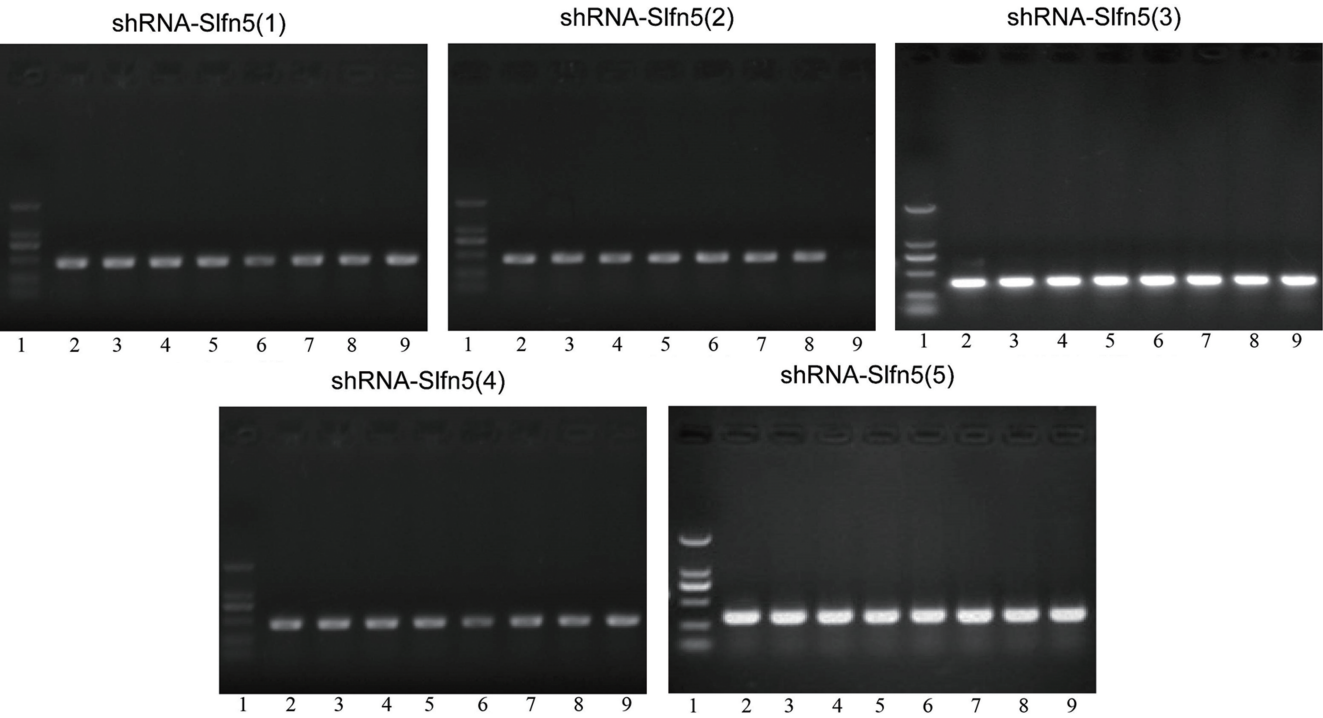
测定腺病毒滴度为 3.95×10¹⁰ PFU/mL。

2.4 干扰质粒转染 293T 细胞的干扰效率

Slfn5 的过表达腺病毒质粒与靶点质粒共转染

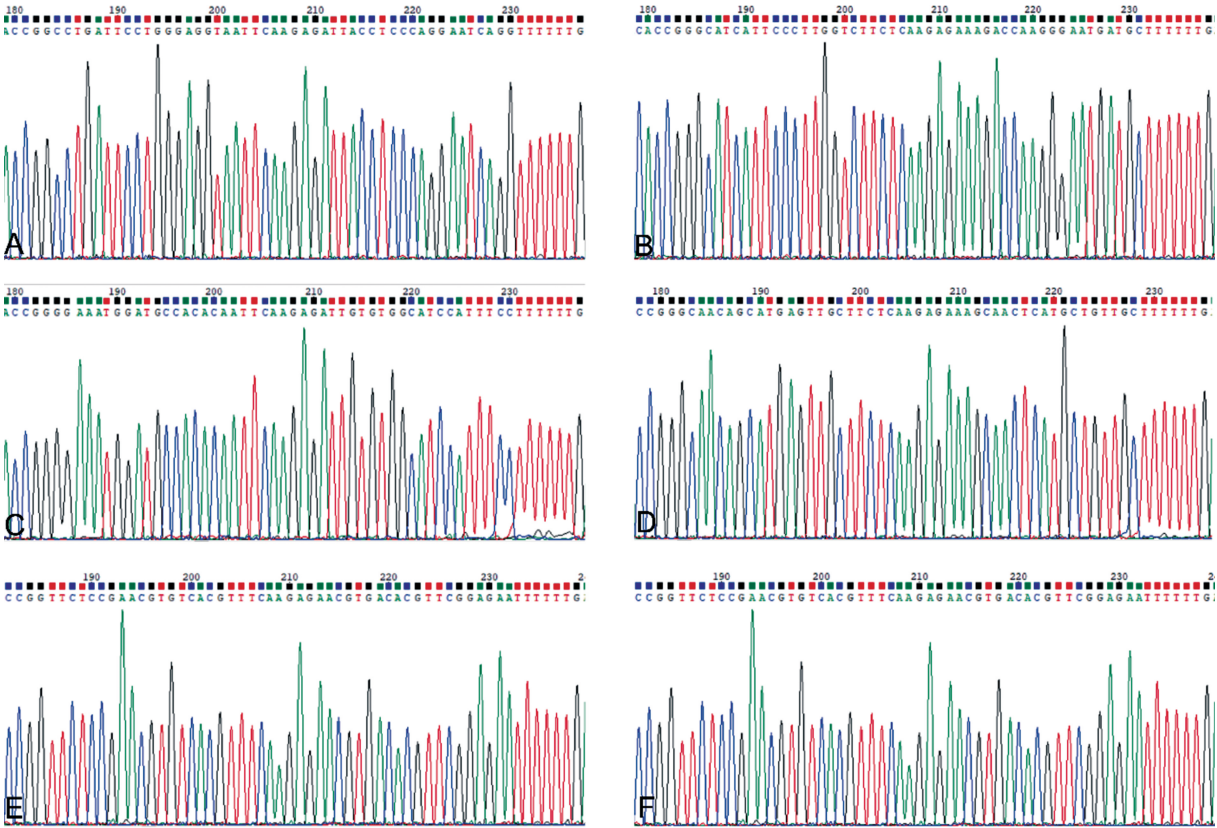
293T 细胞 48 h 后,shRNA-Slfn5(1)、shRNA-Slfn5(4)、shRNA-Slfn5(5)均可明显抑制 Flag 蛋白的表达,而 shRNA-Slfn5(2)和 shRNA-Slfn5(3)无明显干

扰作用(图 4)。因此,确定 shRNA-Slfn5(1)、shRNA-Slfn5(4)、shRNA-Slfn5(5)为目的质粒。



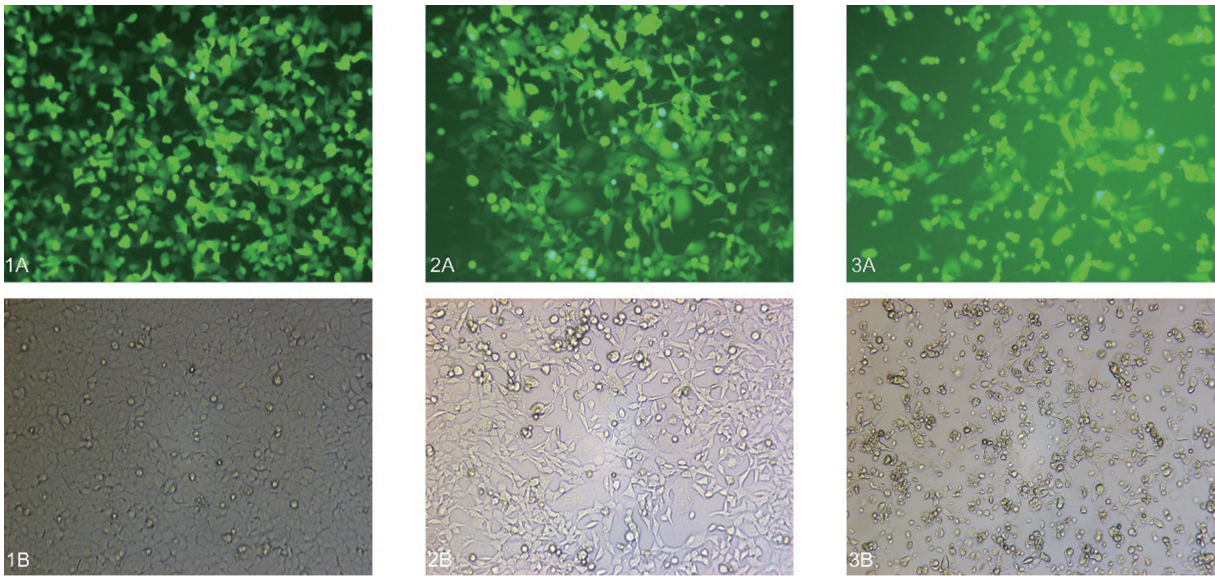
1:marker,从上到下方向依次为 2 000,1 000,750,500,250,100;2~9:挑取的 8 个转化子。

图 1 菌落 PCR 鉴定

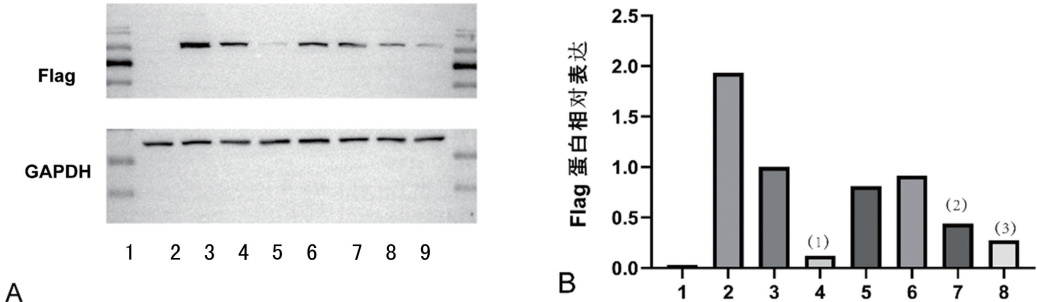


A:shRNA-Slfn5(1);B:shRNA-Slfn5(2);C:shRNA-Slfn5(3);D:shRNA-Slfn5(4);E:shRNA-Slfn5(5);F:shRNA-Slfn5(NC)。

图 2 重组质粒 shRNA-Slfn5 测序峰图

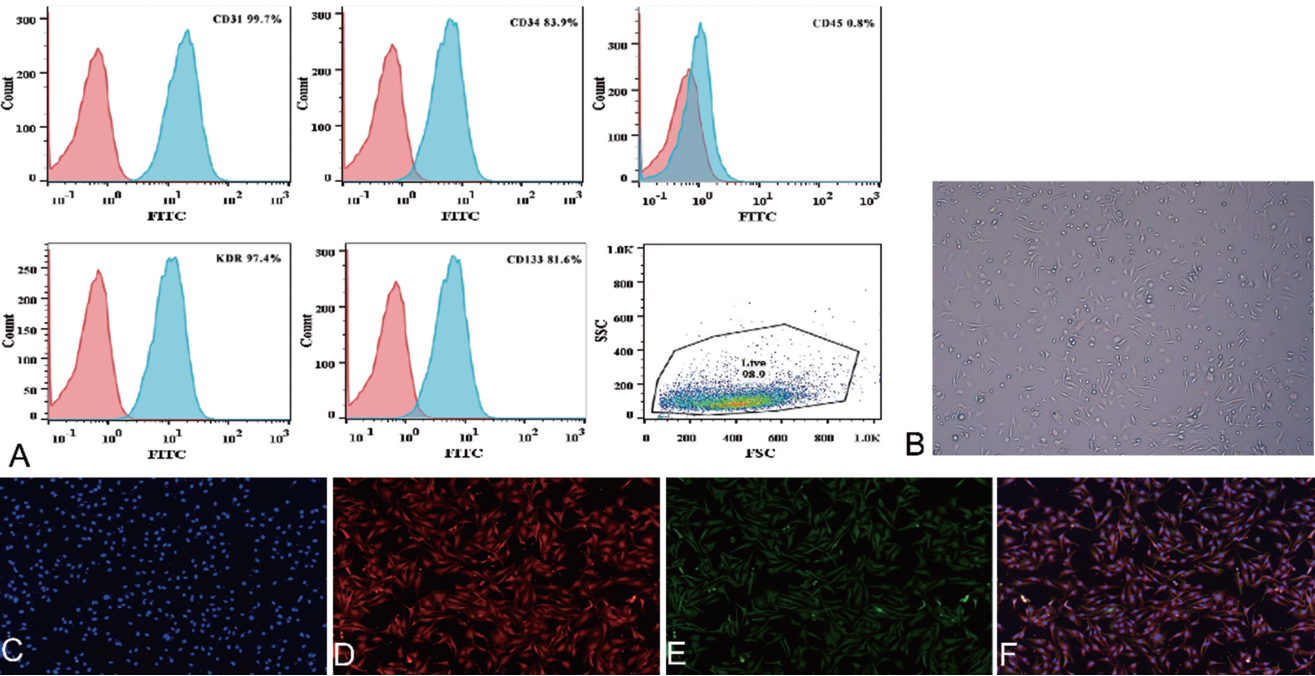


1A、1B:转染 2 d HEK293 细胞;2A、2B:转染 8 d HEK293 细胞;3A、3B:转染 15 d HEK293 细胞。
图 3 荧光显微镜下转染后不同时间段的 293T 细胞 GFP 表达情况(100×)



A: Western blot 蛋白条带[1:marker;2:293T 细胞;3:过表达质粒;4:shRNA-Slfn5(NC);5:shRNA-Slfn5(1);6:shRNA-Slfn5(2);7:shRNA-Slfn5(3);8:shRNA-Slfn5(4);9:shRNA-Slfn5(5)];B:8 个对照组灰度分析[1:293T 细胞;2:过表达质粒;3:shRNA-Slfn5(NC);4:shRNA-Slfn5(1);5:shRNA-Slfn5(2);6:shRNA-Slfn5(3);7:shRNA-Slfn5(4);8:shRNA-Slfn5(5)];(1)、(2)、(3)与对照组比较, $P<0.05$]。

图 4 共转染过表达及干扰质粒 Slfn5 后 293T 细胞 Flag 蛋白的表达



A:通过流式分析 EPCs 中内皮细胞标志物、干细胞标志物的表达;B:在培养 4~7 d 后,分离的脾来源 EPCs 显示出纺锤形形态;C:细胞核用 DAPI(蓝色)染色;D:细胞用 DiI-AC-LDL 标记呈红色;E:FITC-UEA-I 标记呈绿色;F:C、D、E 三者的叠加。

图 5 脾脏来源的单核细胞在体外分化为具有 EPCs 特征的细胞

2.5 EPCs 鉴定与转染效率

大多数细胞 $[(93.00 \pm 2.53)\%]$ 对 DiI-ac-LDL 和 FITC-UEA-I 均呈阳性,鉴定为 EPCs。此外,CD31、CD34、CD45、KDR、CD133 阳性细胞的占比分别为 $(99.70 \pm 3.84)\%$ 、 $(83.90 \pm 2.65)\%$ 、 $(0.80 \pm 2.82)\%$ 、 $(97.40 \pm 2.76)\%$ 、 $(81.60 \pm 2.84)\%$,见图 5。当 EPCs 用重组腺病毒转染 48 h 时,在荧光显微镜下观察到细胞中有强绿色荧光效应的为转染上 shRNA-Slfn5 的 EPCs,转染效率为 $(85.64 \pm 2.58)\%$,见图 6。

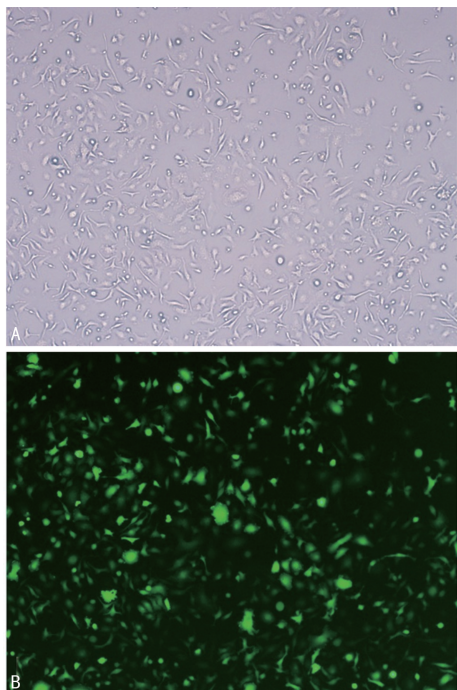


图 6 A:转染 48 h 后白光下 EPCs;B:转染 48 h 后 EPCs 绿色荧光的表达情况。

图 6 EPCs 转染病毒 48 h 后荧光表达情况($\times 200$)

3 讨 论

血管内皮损伤导致动脉粥样硬化性血管疾病的发生和发展,并可能导致新内膜增生,支架内再狭窄和急性支架血栓形成^[8]。因此,血管内皮的再生非常重要。由于 ECs 的增殖能力低,在血管修复过程中,ECs 增殖替代受损内皮的能力受到限制。研究发现,EPCs 在维持内皮完整性方面起着至关重要的作用。当血管内皮发生损伤时,EPCs 被动员并到达损伤部位,分化为 EC 参与新血管形成和组织修复^[9-12]。Slfn5 蛋白及该家族的其他成员的功能仍然很大程度上未知。Slfn5 核定位倾向于支持某些转录调控作用,但尚未完全确定^[13]。Slfn5 可影响多种细胞的生物学行为,但在不同的细胞中,其作用不同:通过在 NIH 3T3 成纤维细胞中过表达 Slfn5 基因,发现成纤维细胞的生长并未受到影响^[14];通过基因干扰的方法敲低 Slfn5 的表达,人类恶性黑色素瘤细胞结果显示

其有双重的作用,不仅促进恶性黑色素瘤细胞的不依赖支持物的生长和克隆形成能力,而且还增强该细胞在三维胶原中的侵袭能力^[15]。

本课题组前期研究显示 Slfn1 可调控 EPCs 的生物学行为^[12]。然而,尚不清楚作为同一基因家族的 Slfn5 是否也与 EPCs 的生物功能有关联。RNA 干扰技术可以用于转录后基因沉默,具有严格的序列特异性、高效性和高稳定性,是疾病基因治疗的理想工具。这种方法已被广泛研究,并已发展成为研究基因功能和肿瘤基因治疗的重要工具^[16]。重组腺病毒在体外和体内转染都是高效的,对于广泛的感染细胞,它可以感染静止细胞和有丝分裂细胞,并且它不整合到宿主细胞基因组中。因此,该腺病毒在基因工程和基因治疗中具有广泛的应用潜力^[17]。本研究选择 shRNA-Slfn5(5)作为目的基因片段,pDKD-CMV-eGFP-U6-shRNA 作为干扰载体,成功地将 shRNA-Slfn5 基因片段插入到重组腺病毒载体中,构建了 shRNA-Slfn5 重组腺病毒,并将其包装到 HEK293A 细胞中。荧光检测和扩增实验表明,shRNA-Slfn5 型腺病毒载体构建成功,并通过转染到 EPCs 内。本研究发现该重组腺病毒能成功感染 EPCs,转染效率为 $(85.64 \pm 2.58)\%$,转染效率较满意,为进一步应用腺病毒表达抑制 Slfn5 研究对 EPCs 生物功能的影响奠定了基础。

参考文献

- [1] LI LU F,LIU H Y,XU C X,et al. VEGF promotes endothelial progenitor cell differentiation and vascular repair through connexin 43[J]. Stem Cell Res Ther,2017,8(1):237.
- [2] LIU F,ZHOU P,WANG Q,et al. The Schlafen family:complex roles in different cell types and virus replication[J]. Cell Biol Int,2018,42(1):2-8.
- [3] CHEN J,KUHN L A. Deciphering the three-domain architecture in schlafens and the structures and roles of human schlafen12 and serpinB12 in transcriptional regulation[J]. J Mol Graph Model,2019,90(1):59-76.
- [4] YANG J Y,DENG X Y,LI Y S,et al. Structure of Schlafen13 reveals a new class of tRNA/rRNA-targeting RNase engaged in translational contr[J]. Nat Commun,2018,9(1):1165.
- [5] 况春燕,张璐,吴强,等. Slfn1 通过下调 Cyclin

- D1 抑制内皮祖细胞的黏附功能[J]. 中国动脉硬化杂志, 2016, 24(1): 1-6.
- [6] WAN G, LIU Y, ZHU J, et al. SLFN5 suppresses cancer cell migration and invasion by inhibiting MT1-MMP expression via AKT/GSK-3 β /beta-catenin pathway[J]. *Cell Signal*, 2019, 59(1): 1-12.
- [7] SASSANO A, MAVROMMATIS E, ARSLAN A D, et al. Human Schlafen 5 (SLFN5) is a regulator of motility and invasiveness of renal cell carcinoma cells[J]. *J Urol*, 2016, 195(4): 1169.
- [8] YAN Y, WANG W B, FAN Y J, et al. Cyclic stretch induces vascular smooth muscle cells to secrete connective tissue growth factor and promote endothelial progenitor cell differentiation and angiogenesis[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 606989.
- [9] QIAO J, DING L, FU J, et al. Endothelial progenitor cells improve the quality of transplanted hematopoietic stem cells and maintain longer term effects in mice[J]. *Ann Hematol*, 2017, 96(1): 107-114.
- [10] YANG J, YU J, LI D, et al. Store-operated calcium entry-activated autophagy protects EPC proliferation via the CAMKK2-MTOR pathway in ox-LDL exposure[J]. *Autophagy*, 2017, 13(1): 82-98.
- [11] ZHU G, WANG J, SONG M, et al. Overexpression of jagged1 ameliorates aged rat-derived endothelial progenitor cell functions and improves its transfection efficiency for rat balloon-induced arterial injury[J]. *Ann Vasc Surg*, 2017, 41(2): 241-258.
- [12] KUANG C Y, YANG T H, ZHANG Y, ZHANG L, WU Q. Schlafen 1 inhibits the proliferation and tube formation of endothelial progenitor cells[J]. *PloS one*, 2014, 9(10): e109711.
- [13] WAN G, ZHU J, GU X, et al. Human Schlafen 5 regulates reversible epithelial and mesenchymal transitions in breast cancer by suppression of ZEB1 transcription[J]. *Br J Cancer*, 2020, 123(4): 633-643.
- [14] HU Q, TAN H, IRWIN D M. Evolution of the vertebrate resistin gene family[J]. *PloS one*, 2015, 10(6): e0130188.
- [15] GUO L, LIU Z, TANG X. Overexpression of SLFN5 induced the epithelial-mesenchymal transition in human lung cancer cell line A549 through beta-catenin/Snail/E-cadherin pathway[J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 862: 172630.
- [16] SCHUSTER A, ERASIMUS H, FRITAH S, et al. RNAi/CRISPR Screens: from a Pool to a Valid Hit[J]. *Trends Biotechnol*, 2019, 37(1): 38-55.
- [17] ZHANG W, EHRHARDT A. Getting genetic access to natural adenovirus genomes to explore vector diversity[J]. *Virus Genes*, 2017, 53(5): 675-683.

(收稿日期: 2020-09-10 修回日期: 2021-01-04)