

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2011.00757

## Pol II型启动子 K14 实现组织特异 RNAi

代蓉<sup>1,2</sup>, 沈思军<sup>1</sup>, 万鹏程<sup>1,2</sup>, 石国庆<sup>1,2</sup>, 孟庆勇<sup>3</sup>, 刘守仁<sup>1,2</sup>

1. 石河子大学动物科技学院, 石河子 832000;
2. 新疆农垦科学院新疆兵团绵羊繁育生物技术重点实验室, 石河子 832000;
3. 中国农业大学农业生物技术国家重点实验室, 北京 100193

**摘要:** RNAi(RNA interference, RNAi)是继基因打靶技术后的一种高效的研究基因功能的方法。细胞学实验和小鼠模型的研究结果表明, Pol II型启动子可以实现组织特异的 RNA 干扰, 从而为鉴定基因在特定组织中的功能及作用机理提供了一个强有力的研究方法。为了能将这种方法用于转基因绵羊生产, 探讨基因与绵羊毛囊发育的关系及其作用机制等, 文章利用 Pol II型 *CMV* 启动子和毛囊组织特异表达的人角蛋白 14 (*K14*)基因的启动子驱动 eGFP-shRNA 融合转录本的生成, 从而实现敲低目的基因的表达。体外基因表达沉默效率分析(pEGFP-C1-shRNA 和 psiCHECK-BMP4 双质粒共转染 Hela 细胞)结果表明, 6 个干扰序列均能有效地抑制 *BMP4* 基因的表达, 抑制效率达到 60% 以上; 体内表达沉默分析(只转染 pEGFP-K14-shRNA 质粒转染小鼠皮肤细胞系 JB6-C41)的实验结果与体外分析结果相似, 除 3<sup>#</sup>序列外, 其余干扰序列对 *BMP4* 基因的抑制效率都在 60% 以上, 其中 5<sup>#</sup>序列的效率达到 80% 以上。siRNA 诱导的目标基因沉默中 mRNA 和蛋白水平的下降显著正相关。结果表明, 设计构建的由 Pol II型启动子 *K14* 驱动 eGFP-shRNA 融合转录本的形成, 从而实现 RNAi 的研究方法是可行的, 利用这种方法可以在特定细胞中敲低目的基因的表达水平。为在大家畜特别是绵羊中应用 RNAi 的方法分析目的基因在毛囊发育、对不同类型毛囊生长发育的诱导和调节等作用机理的研究提供一个参考方法。

**关键词:** 组织特异; RNAi; K14 启动子; 融合转录本; 转基因家畜

## shRNAs driven by K14 promoter induce tissue-specific RNA interference

DAI Rong<sup>1,2</sup>, SHEN Si-Jun<sup>1</sup>, WAN Peng-Cheng<sup>1,2</sup>, SHI Guo-Qing<sup>1,2</sup>, MENG Qing-Yong<sup>3</sup>, LIU Shou-Ren<sup>1,2</sup>

1. College of Animal Science, Shihezi University, Shihezi 832000, China;
2. Breed & Biotechnology Key Laboratory of Sheep in Production and Construction Corps of Xinjiang, Xinjiang Agricultural Reclamation Academy, Shihezi 832000, China;

收稿日期: 2010-10-09; 修回日期: 2011-01-26

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项(编号: 2008ZX08008-001, 2009ZX08008-001B)和国家自然科学基金项目(编号: 31001002)资助

作者简介: 代蓉, 博士研究生, 助理研究员, 研究方向: 动物分子遗传与育种。Te: 13364984321; E-mail: dairong1@163.com

通讯作者: 刘守仁, 本科, 研究员, 研究方向: 绵羊分子遗传与育种。E-mail: nkyysb@163.com

孟庆勇, 博士, 副教授, 研究方向: 细胞生物学。E-mail: qingyong.meng@gmail.com

致谢: 感谢中国农业大学农业生物技术国家重点实验室李宁院士对本实验的指导; 感谢中国农业大学胡晓湘、郭英、费菁老师在实验进行过程中给予的帮助; 感谢新疆农垦科学院甘尚权博士及农业生物技术国家重点实验室刘炜玮、伊娜、成功、陈敏、张宏等同学对文章提出的建议; 感谢农业生物技术国家重点实验室李淑芝、贾春霞、胡石丽等工作人员的协助。

网络出版时间: 2011-5-23 16:47:08

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20110523.1647.001.html>

3. State Key Laboratory for Agrobiotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China

**Abstract:** RNA interference is an efficient method for exploring gene function. Accumulating evidence suggests that RNA Pol II promoters can direct cell- or tissue-specific gene silencing. A eGFP-shRNA fusion construct transcribed from an RNA Pol II promoter (K14 promoter) was used to induce gene-specific shRNA silencing of *BMP4* gene expression. Recombinant vectors (pEGFP-C1-shRNA, psiCHECK-BMP4, and pEGFP-K14-shRNA) were constructed. Vectors pEGFP-C1-shRNA and psiCHECK-BMP4 were cotransfected into HeLa cells (*in vitro*) and shRNA-induced inhibition efficiency was tested by a luciferase assay. The results showed that all the six interference sequences inhibited the expression of BMP4 with high efficiency (>60%), and the interference sequence 5<sup>#</sup> showed the highest efficiency. For *in vivo* screening of JB6-C41 cells transfected with vector pEGFP-K14-shRNA, the inhibition efficiency was assayed by quantitative RT-PCR and Western blotting analyses. The results showed that the mRNA and protein products of the exogenous *BMP4* gene were efficiently and specifically inhibited. The efficiency of gene silencing was greater than 60%, except for sequence 3<sup>#</sup>. The declines in mRNA and protein expression levels were significantly correlated during gene silence by the shRNA. This system may be adapted for *in vivo* shRNA expression and gene silencing. This method may provide a novel approach for the application of RNAi technology in suppressing gene expression in the analysis of the mechanisms of hair follicle development in sheep.

**Keywords:** tissue-specific; RNAi; K14 promoter; fusion construct; transgenic livestock

骨形成蛋白 4 (BMP4)是 TGF- $\beta$  超家族中的一个分泌型蛋白, 通过与其特异的受体相互作用发挥功能, 生物活性拮抗物(Noggin)调节。*BMP4* 基因在胚胎期和周期循环过程的毛球间质细胞和表皮广泛表达, 许多研究表明该基因在毛囊形态发生和周期循环中起着重要的调节作用。毛基质角质细胞里过表达 *noggin*(*Msx-2* 启动子)的转基因小鼠, 使毛基质里影响角质细胞增殖/分化的细胞因子表达水平发生改变, 导致毛发生长异常, 缺少外部的毛发<sup>[1]</sup>。过表达 *noggin* 转基因小鼠(*K5* 启动子<sup>[2]</sup>或 *NSE* 启动子<sup>[3]</sup>)缺少 zig-zag 型毛发。将敲除 *noggin* 的小鼠皮肤移植到 SCID 小鼠上, 使 *BMP4* 长期过量表达, 导致初级毛囊发育停滞在毛干形成起始前<sup>[4]</sup>。在毛囊上皮细胞中条件性敲除 *BMP4* 的受体 *BMPRII* 基因, 小鼠的内毛根鞘和毛干形态都发生很大的改变<sup>[5]</sup>。这些都证明 *BMP4* 基因在不同毛囊类型的发育过程中发挥重要的作用。

RNA 干扰是指在进化过程中高度保守的, 由双链 RNA(double-stranded RNA, dsRNA)诱发的同源 mRNA 高效特异性降解, 从而导致基因的转录后沉默的现象, 是一种高效抑制和沉默基因表达的方法。与基因打靶相比, 它的操作更为简便快捷, 因此它越来越广泛的应用于基因功能的研究、疾病治疗等很多领域。常用 shRNA 表达载体的方法实现持续的 RNA 干扰<sup>[6]</sup>, 大多数由 Pol III型启动子驱动, 包

括 *U6*、*H1* 和 *tRNA* 启动子。这些启动子的特点是高效表达 shRNA, 从而介导高效的抑制, 表达结构比较小且简单, 易于插入基因组中, 而这类启动子驱动外源基因在动物机体广谱表达所以无法实现组织细胞特异性。

已有的研究已经鉴定出很多 Pol II型启动子, 并且成功地制作了转基因动物。那么, 是否也可以将 Pol II型启动子进行细胞或组织特异的基因沉默? 有研究者利用 *Cre/LoxP* 系统制备条件性敲低转基因小鼠模型<sup>[7]</sup>。Ling 等<sup>[8]</sup>将 shRNA 连入 *eGFP* 基因终止密码子之前, 由 *CMV* 启动子驱动, 实现了目的基因的表达沉默。在此研究基础上, 本研究利用 Pol II型的 *K14* 启动子表达生成 eGFP-shRNA 融合转录本, 从而实现 RNAi, 为研究特定基因对畜禽毛囊生长发育及毛发特性的影响及其作用机制提供一个参考的方法。采用这种设计, 即避免基因敲除中技术等方面的要求, 又不需要组织特异表达 *Cre* 酶的转基因动物, 直接使用一个载体实现了组织特异的 RNAi, 为研究大家畜中基因功能提供了一个方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

小鼠皮肤细胞系 JB6-C41 (中国农业大学生物技术学院刘炜玮博士惠赠), HeLa 细胞和 DH5 $\alpha$  感受态细胞由中国农业大学农业生物技术国家重点实

实验室保存。人抗凝血自北京红十字血液中心。引物均由北京奥科生物技术有限公司合成。

## 1.2 方法

### 1.2.1 RNAi 靶点设计及双链合成

以 NCBI 公布的小鼠 *BMP4* 基因序列(NM\_0075540), 利用网上在线软件设计针对该基因的干扰序列 6 个(<http://jura.wi.mit.edu/bioc/siRNAext>), 将所有序列打乱后设计一个随机序列(random)的对照<sup>[8]</sup>。序列为:

- 1<sup>#</sup>: 5'-GCCGUCAUUCCGGAUUACAUG-3';
- 2<sup>#</sup>: 5'-GCGACACUUCUACAGAUGUUU-3';
- 3<sup>#</sup>: 5'-AACCCAAUUAUGGGCUGGCCAUU-3';
- 4<sup>#</sup>: 5'-GGUCCAGGAAGAAGAAUAAGA-3';
- 5<sup>#</sup>: 5'-UCCCAAGAAUCAUGGACUG-3';
- 6<sup>#</sup>: 5'-GGACACCAGACUAGUCCAUCA-3'。

random: 5'-GACUAACGCAAGUCCACUGAU-3'  
依据袁晶<sup>[9]</sup>的方法设计合成茎环结构的寡核苷酸单链, 在两条配对单链的 5'端分别加入 *Bam* H I、*Hind* 酶切位点, loop 环序列为 TTCAAGAGA。寡核苷酸单链(上海生工生物工程技术有限公司合成)体外复性成双链(复性缓冲液: 100 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 10 mmol/L EDTA, pH 8.0; 1 mol/L NaCl。复性程序: 95 °C 孵育 10 min, 关闭电源缓慢冷却至室温), 取 5 μL 500 nmol/L 的复性产物经 5%的琼脂糖凝胶电泳检测。与寡核苷酸单链相比, 复性双链有两条带, 一条分子量比单链大另一条与单链大小相同。正确复性的双链在 T4 DNA 连接酶的作用下与 *Bam* H I 和 *Hind* 酶切后回收的载体片段连接。

### 1.2.2 重组质粒的构建

pEGFP-shRNA 融合表达载体的构建(图 1): 限制性内切酶 *Bam* H I 和 *Hind* 酶切质粒 pEGFP-C1, 回收目的片段。在 T4 DNA 连接酶的作用下, 酶切后的质粒片段与体外复性的双链 DNA 室温反应 30 min, 连接产物转化 DH5α 感受态细胞, 涂布到含卡那霉素的平板上, 37 °C 培养 8~12 h, 用 PCR 方法筛选阳性克隆。PCR 引物见表 1。菌体 PCR 筛选出的阳性克隆测序鉴定。

毛囊组织特异的表达载体 pEGFP-K14-shRNA 的构建(图 1): 从人抗凝血中提取人基因组 DNA, 参考 NCBI 公布的人 *K14* 基因启动子序列(AB091380)设计引物(表 1)。PCR 产物和 pEGFP-C1 质粒经 *Ase* I 和 *Age* I 双酶切, 电泳回收目的片段, T4 DNA 连接酶

16 连接过夜, 连接产物转化至 DH5α 感受态细胞, 挑取单克隆, 菌落 PCR 鉴定的阳性克隆测序验证。

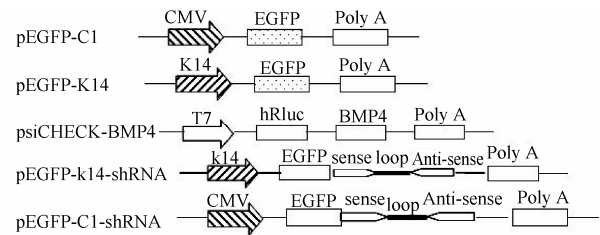


图 1 重组表达载体构建模式图

表 1 引物序列表

名称	序列(5'→3')
shRNA-F	AACGAGAAGCGCGATCACATG
shRNA-R	GGTATGGCTGATTATGATCAG
K14-F	<u>GCGATTAATCCCTGCATAAGAAGGAGACA</u>
K14-R	<u>CGCTATACCGGTAAGGCTGAGTGAAGAGAAGG</u> <u>CCGCTCGAGTTCTCTGAGCCTTCCAGCAAG</u>
BMP4-F	<u>AAGGAAAAAAGCGGCCCTCTGGACTGCC</u>
BMP4-R	TGATCTCAGC
BMP4-QF	TGAGCCTTCCAGCAAGTTTGT
BMP4-QR	CGGTTACCAGGAATCATGGTGT
<i>β-actin</i> -QF	CAGATGTGGATCAGCAAGC
<i>β-actin</i> -QR	GCGCAAGTTAGGTTTGTGTC

注: 酶切位点(斜体), 保护碱基(下横线)。

psiCHECK-BMP4 表达载体的构建(图 1): 参考 NCBI 公布的小鼠 *BMP4* mRNA 序列(NM\_0075540), 设计 PCR 引物(表 1), 上下游引物 5'端分别带有 *Xho* I 和 *Not* I 酶切位点, 并加保护碱基。Trizol(北京天根)法提取小鼠肝脏组织的总 RNA, 在 M-MLV 反转录酶(Promega)的作用下合成第一链 cDNA, 并以此为模板, 扩增 *BMP4* 基因的完整编码区。*Xho* I 和 *Not* I 双酶切 PCR 产物和 psiCHECK-2 质粒, 回收目的片段后连接, 转化 DH5α 感受态细胞, 菌体 PCR 鉴定的阳性克隆测序验证。

### 1.2.3 细胞培养

Hela 细胞在含 10% FBS (Hyclone) 的 DMEM 培养液中, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下常规培养。JB6-C41 细胞在含 5% FBS(需灭活的)的 DMEM 培养基中 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养。

### 1.2.4 细胞转染

按 Lipofection 2000 (Invitrogen) 转染试剂说明书进行细胞转染。质粒 psiCHECK-BMP4 和 pEGFP-K14-shRNA(摩尔比 1:3)共转染 Hela 细胞, 进行干扰序列沉默效率的体外筛选。pEGFP-K14-shRNA 质粒转染 JB6-C41 细胞, 用于进行体内干扰实验, 转染

方法及用量参照说明书进行。

### 1.2.5 荧光素酶活性检测

细胞转染 48 h 后, 实验组和对照组各做两个重复, 每一重复分成 3 个样品检测萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶活性。参照 Dual-Glo (Promega) 说明书进行细胞的裂解、收集、检测及数据分析, 在 Turner Biosystems 公司的 Veritas™ 微孔板光度计上测定荧光素酶活性。

### 1.2.6 基因表达检测

选择 SYBR Green I (ABI) 荧光定量法, 利用实时荧光定量 PCR(Q-PCR) 方法检测转染后 JB6-C41 细胞中 *BMP4* 基因的表达变化, 以  $\beta$ -actin 为内参, 用  $2^{-Ct}$  的方法处理数据(引物见表 1)。每个实验组和对照组均做两个重复, 每一重复检测 3 次, 标准化后计算干扰效率。Western 杂交参考 PVDF 膜(GE)提供的方法进行。

## 2 结果与分析

### 2.1 重组质粒的鉴定

用 PCR 方法成功克隆了 2 000 bp 的人 *K14* 启动子区, PCR 产物与 pEGFP-C1 载体酶切后连接, 经 PCR 鉴定的阳性质粒测序验证插入的片段大小和方向正确, 成功替换了载体的 *CMV* 启动子。以小鼠组织 RNA 为模板克隆得到了小鼠 *BMP4* 基因的完整编码区, 重组的表达载体 psiCHECK-BMP4 经 PCR 鉴定和测序验证插入正确。干扰载体 PCR 鉴定阳性克隆扩增片段大小为 250 bp, 与实验设计相同, 测序结果表明正确插入(PCR 鉴定及测序结果未给出)。

### 2.2 *BMP4* 表达抑制结果

#### 2.2.1 荧光素酶检测

pEGFP-C1-shRNA 和 psiCHECK-BMP4 双质粒共转染 HeLa 细胞, 48 h 后收集细胞, 检测荧光素酶活性(图 2)。测定的结果表明, 6 个干扰序列都能在 mRNA 水平显著地抑制 *BMP4* 基因的表达, 抑制效果都在 60% 以上, 其中 5<sup>#</sup> 干扰序列的抑制效率最高, 达到 70% 以上。

#### 2.2.2 Q-PCR 结果

为了验证 *K14* 启动子是否能驱动融合转录本生

成, 表达 shRNA, 从而抑制 *BMP4* 基因的表达, 选择

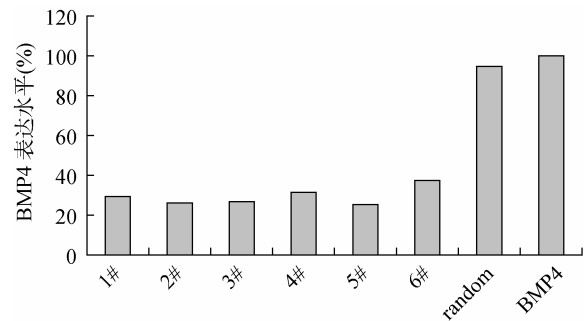


图 2 荧光素酶检测基因表达抑制效果

1<sup>#</sup>-6<sup>#</sup>: 干扰序列 1<sup>#</sup>-6<sup>#</sup>实验组; random: 随机序列对照组; BMP4: 转染 psiCHECK-BMP4 质粒的对照组。

质粒 pEGFP-K14-shRNA 转染有内源性小鼠 *BMP4* 基因表达的 JB6-C41 细胞, 48 h 后收集细胞提取总 RNA, 用实时定量 PCR 方法分析目的基因在 mRNA 表达水平的变化。以小鼠的  $\beta$ -actin 为内对照,  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法处理数据。从图 3 中可以看出, 与只转染空白质粒即 pEGFP-K14 的对照组相比, 随机序列组 *BMP4* 基因 mRNA 表达水平的变化不明显, 而在 6 个实验组中 *BMP4* 基因的表达水平明显下调, 除 3<sup>#</sup> 干扰序列外, 其余的 5 条干扰序列的抑制效率都在 60% 以上, 其中干扰序列 1、2 和 5 的干扰效率达到 80% 以上。由此证明利用 *K14* 启动子可以驱动融合转录本生成并有效地抑制 *BMP4* 基因的表达, 其抑制效率与荧光素酶筛选分析的结果相近。表明本研究设计的方法实现体内 RNAi 是可行的。

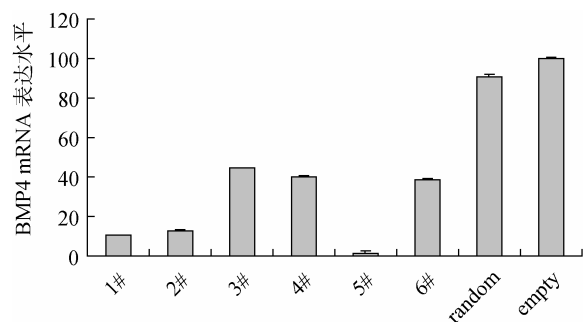


图 3 实时定量 PCR 检测 JB6-C41 细胞中 *BMP4* mRNA 表达变化

Empty: 转染质粒的对照组; random: 随机序列对照组; 1<sup>#</sup>-6<sup>#</sup>: 干扰序列 1<sup>#</sup>-6<sup>#</sup>实验组。

#### 2.2.3 Western 杂交结果

哺乳动物细胞中的 RNAi 是由于目标基因的 mRNA 水平下降而导致目标蛋白翻译水平下降。为

了检测干扰后蛋白水平的表达是否也发生与 mRNA 表达水平相似的变化, 选择 BMP4 多克隆抗体(Santa Cruz, sc-6896), 用 Western 杂交的方法分析蛋白表达水平的变化(图 4)。杂交结果显示, 在设计的 6 个干扰序列中, 均能有效地抑制 JB6-C41 细胞中 BMP4 蛋白的表达, 特别是 5<sup>#</sup>干扰序列的抑制效率达到 90%以上, 与实时定量 PCR 的结果相似。试验结果从蛋白表达水平提供证据进一步表明选择基于生成融合转录本表达小干扰 RNA, 实现体内基因表达沉默的方法是可行的。

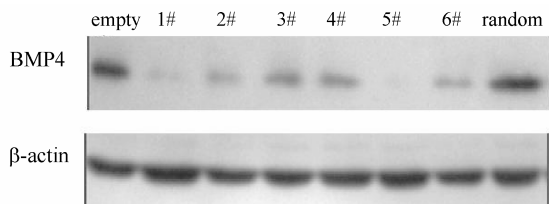


图 4 JB6-C41 细胞中 BMP4 蛋白表达抑制效果分析  
Empty: 转染质粒的对照组; random: 随机序列对照组; 1<sup>#</sup>~6<sup>#</sup>: 干扰序列 1<sup>#</sup>~6<sup>#</sup>实验组。

### 3 讨论

本研究利用无鼠源 BMP4 基因表达的 HeLa 细胞为研究对象, 采用荧光素酶报告系统检测 6 条待筛干扰序列对靶基因 BMP4 的抑制效果。为排除 HeLa 细胞内源人 BMP4 基因表达对干扰结果的影响, 我们比对分析了人和小鼠 BMP4 基因序列的同源性, 发现它们的同源性为 91%。设计的 6 条干扰序列及随机阴性对照序列在人的 BMP4 基因上无明显的同源性, 无靶位关系, 从而保证干扰结果不受细胞内源基因表达的影响。故而设计了体外表达小鼠 BMP4 基因的荧光素酶载体, 将其与干扰载体共转染 HeLa 细胞, 通过检测海肾荧光素酶和萤火虫荧光素酶的活性比值确定干扰效果。设计的 6 条干扰序列对靶基因表达的抑制效率都在 60%以上, 其中 5<sup>#</sup>的抑制效率最高, 达到 70%以上, 表明这 6 条干扰序列都可用于后续的研究。

为了进一步在验证设计的干扰序列对内源小鼠 BMP4 基因表达的抑制效果, 本实验选择有内源小鼠 BMP4 基因表达的小鼠皮肤细胞株 JB6-C41。JB6-C41 细胞株是从原代培养的正常的 BALB/c 小鼠皮肤的表皮细胞中建立的上皮类型的细胞株, 是用于研究基因对皮肤及毛囊发育影响的较为理想的细胞

模型。该细胞表达内源性小鼠 BMP4, 是检测设计的 6 个干扰序列干扰效果的理想细胞。因此我们只转染干扰载体, 48 h 后收集细胞利用实时定量 PCR 和 Western 杂交检测干扰效果, 结果表明内源性 BMP4 基因在 mRNA 和蛋白水平都明显抑制(抑制效率 60%以上, 其中以 5<sup>#</sup>的抑制效率最高, 达到 90%以上), 此结果与体外荧光素酶筛选的结果一致。本结果为进一步利用转基因小鼠模型验证 BMP4 基因在不同类型毛囊发育中的调控作用奠定了基础。

利用 Pol II 型启动子实现组织特异 RNAi 目前已经被广泛应用。Ling 等<sup>[8]</sup>以在正常组织中表达量极低, 但在肿瘤组织中表达里极高的凋亡蛋白家族的抑制子存活素(survivin)为靶基因, 设计 shRNA 序列, 并连入 pEGFP-C1 载体中 eGFP 终止密码子的前面, 结果实现了有效的 RNAi。Yuan 等<sup>[10]</sup>也采用相同的方法用 CMV 启动子驱动融合转录本的生成实现 RNAi。但迄今为止还鲜有利用 K14 启动子对皮肤和毛囊发育相关基因采用这种方法进行功能研究。本研究采用此种融合表达载体的方法, 对潜在影响小鼠毛囊发育的 BMP4 基因进行 RNAi 研究, 并成功地实现了 BMP4 基因的特异干扰。

与 CMV 启动子相比, K14 启动子的活性不如 CMV 高, 但 K14 启动子是一个常用的驱动外源基因在毛囊和皮肤组织特异表达的启动子。人角蛋白 14 是一个 I 型角蛋白, Fuchs 小组是最早开始人角蛋白基因克隆和功能研究分析的小组, 他们最先从培养的人表皮细胞中克隆得到了一个 50 kDa 的人表皮角蛋白, 随后克隆得到了人 K14 基因的全长 cDNA, 预测该蛋白有两个  $\alpha$ -螺旋<sup>[11]</sup>, 且与一个 56 kDa 的 II 型角蛋白配对<sup>[12]</sup>。NCBI 数据库中的资料显示人角蛋白 14 主要支气管上皮细胞、皮肤和舌中高表达, 在胸腺、扁桃体和嗅球中有低水平表达。Fuchs 研究小组首先克隆人 K14 基因的启动子, 利用该启动子表达神经肽 P 物质, 导入转基因小鼠的生殖系中时表现出与内源基因相似的表达, 即都在复层鳞状上皮基底层里表达<sup>[13]</sup>。利用荧光素酶分析该启动子在角质化细胞和乳腺癌细胞中的表达差异, 结果表明在角质细胞中荧光报告子的表达量显著高于乳腺癌细胞<sup>[14]</sup>。国内外研究人员利用 K14 启动子进行了大量与皮肤和毛囊发育基因功能的研究。利用 K14 启动子构建了在表皮基底角质细胞里过表达 TGF- $\alpha$ <sup>[15]</sup>、IL-6<sup>[16]</sup>、ICAM-1<sup>[17]</sup>等的转基因小鼠。任红艳等<sup>[18]</sup>利

用该启动子序列构建了皮肤特异表达 *c-Myc* 基因的真核表达载体, 通过原核显微注射技术获得了皮肤中特异表达外源基因的转基因小鼠。潘巍巍等<sup>[19]</sup>在总结国内外对人乳头瘤病毒(HPV)与人类皮肤疾病的关系的研究中发现, *K14* 启动子靶向作用于表皮, 从而使 HPV 的癌蛋白定向在表皮中表达, 实现了组织特异性, 并且避免引起其他脏器或细胞的恶性增长。王勇等<sup>[20]</sup>通过受精卵原核显微注射技术制作了由 *K14* 启动子驱动表达 *HCTLA4-Ig* 的转基因小鼠, Northern 杂交分析表明, 该基因在转基因小鼠体内呈现皮肤组织特异性高效表达, 并且稳定遗传。本研究小组也利用不同的报告基因系统, 分析了 *K14* 启动子在不同类型细胞中的表达活性, 结果表明扩增得到的 *K14* 启动子能有效的驱动报告基因在特定细胞高效表达(另文发表)。以上研究结果都表明, *K14* 启动子能有效的实现外源基因在毛囊和皮肤组织的表达, 为本研究中实现毛囊和皮肤组织特异 RNAi 奠定基础。

本研究建立了一套有效的实现抑制目的基因表达的方法, 在人和小鼠的细胞里都能有效的表达 siRNA。利用在皮肤和毛囊组织特异高表达的 Pol II 型启动子 *K14* 驱动 eGFP-shRNA 融合转录本表达, 得到较好的干扰效果, 十分显著地抑制目的基因的表达。为通过转基因动物模型研究特定基因在特异组织中的功能和作用机制提供了一个有力的参考方法。

#### 参考文献(References):

- [1] Kulessa H, Turk G, Hogan BLM. Inhibition of Bmp signaling affects growth and differentiation in the anagen hair follicle. *EMBO J*, 2000, 19(24): 6664–6674.
- [2] Sharov AA, Weiner L, Sharova TY, Siebenhaar F, Atayan R, Reginato AM, McNamara CA, Funa K, Gilchrist B A, Bissette JL, Botchkarev VA. Noggin overexpression inhibits eyelid opening by altering epidermal apoptosis and differentiation. *EMBO J*, 2003, 22(12): 2992–3003.
- [3] Guba U, Mecklenburg L, Cowin P, Kan L, O'Guin WM, D'Vizio D, Pestell RG, Paus R, Kessler JA. Bone morphogenetic protein signaling regulates postnatal hair follicle differentiation and cycling. *Am J Pathol*, 2004, 165(3): 729–740.
- [4] Botchkarev AV, Botchkareva NV, Sharov AA, Funa K, Huber O, Gilchrist BA. Modulation of BMP signaling by noggin is required for induction of the secondary (nonyltothrich) hair follicle. *J Invest Dermatol*, 2002, 118(1): 3–10.
- [5] Andl T, Ahn K, Kairo A, Chu EY, Wine-Lee L, Reddy ST, Croft NJ, Cebra-Thomas JA, Metzger D, Chambon P, Lyons KM, Mishina Y, Seykora JT, Crenshaw EB, Millar SE. Epithelial *Bmpr1a* regulates differentiation and proliferation in postnatal hair follicles and is essential for tooth development. *Development*, 2004, 131(10): 2257–2268.
- [6] 张定校, 樊斌, 刘榜, 李奎. RNA 干扰 (RNAi) 技术应用于哺乳动物细胞的研究策略. *遗传*, 2005, 27(5): 839–844.
- [7] Ventura A, Meissner A, Dillon CP, McManus M, Sharp PA, Van Parijs L, Jaenisch R, Jacks T. Cre-lox-regulated conditional RNA interference from transgenes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(28): 10380–10385.
- [8] Ling X, Li FZ. Silencing of antiapoptotic survivin gene by multiple approaches of RNA interference technology. *Biotechniques*, 2004, 36(3): 450–460.
- [9] 袁晶. 鸡细胞中基于载体的 RNA 干扰研究[学位论文]. 北京: 中国农业大学, 2007.
- [10] Yuan J, Wang XB, Zhang Y, Hu XX, Deng XM, Fei J, Li N. shRNA transcribed by RNA Pol II promoter induce RNA interference in mammalian cell. *Mol Biol Rep*, 2006, 33(1): 43–49.
- [11] Hanukoglu I, Fuchs E. The cDNA sequence of a human epidermal keratin: Divergence of sequence but conservation of structure among intermediate filament proteins. *Cell*, 1982, 31(1): 243–252.
- [12] Hanukoglu I, Fuchs E. The cDNA sequence of a type II cytoskeletal keratin reveals constant and variable structural domains among keratins. *Cell*, 1983, 33(3): 915–924.
- [13] Vassar R, Rosenberg M, Ross S, Tyner A, Fuchs E. Tissue-specific and differentiation-specific expression of a human K14 keratin gene in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86(5): 1563–1567.
- [14] Staggers WR, Paterson AJ, Kudlow JE. Sequence of the functional human keratin K14 promoter. *Gene*, 1995, 153(2): 297–298.
- [15] Vassar R, Fuchs E. Transgenic mice provide new insights into the role of TGF- $\alpha$  during epidermal development and differentiation. *Genes Dev*, 1991, 5(5): 714–727.
- [16] Turksen K, Kupper T, Degenstein L, Williams I, Fuchs E. Interleukin 6: insights to its function in skin by overexpression in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(11): 5068–5072.
- [17] Williams IR, Kupper TS. Epidermal expression of intercellular adhesion molecule 1 is not a primary inducer of cutaneous inflammation in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(21): 9710–9714.
- [18] 任红艳, 张兴举, 杨述林, 崔文涛, 唐中林, 李奎. c-Myc 转基因小鼠构建的改良方法. *农业生物技术学报*, 2008, 16(1): 37–40.
- [19] 潘巍巍, 赖国旗, 宋方洲. 角蛋白启动子在人乳头瘤病毒的转基因小鼠中的研究进展. *四川动物*, 2006, 25(4): 903–905.
- [20] 王勇, 王峰超, 魏泓, 倪勇, 吴军, 高翔. 皮肤组织特异性表达 hCTLA4-Ig 转基因小鼠品系的建立. *遗传学报*, 2005, 32(9): 916–922.