

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.25.001

文章编号: 1005-8982(2017)25-0001-07

基础研究·论著

MicroRNA-29b-3p 重组腺相关病毒制备及 在大鼠前额叶皮质中的表达研究*

李茂,冯建国,王晓斌,陈前修,万运强
(西南医科大学附属医院 麻醉科,四川 泸州 646000)

摘要:目的 获得表达 microRNA-29b-3p 的重组腺相关病毒(rAAV-miR-29b-3p),并检测其在大鼠前额叶皮质中的感染效果和表达水平。**方法** 将前体 miR-29b-3p 基因片段置入 AAV 表达质粒中构建重组 AAV 质粒,将重组 AAV 质粒、包装质粒和辅助质粒通过脂质体 LipaFiter™ 共转染 HEK293 细胞包装 rAAV-miR-29b-3p。从转染的 HEK293 细胞中收集并通过树脂柱纯化 rAAV-miR-29b-3p,通过实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)测定 rAAV-miR-29b-3p 滴度。通过脑立体定位仪注射 rAAV-miR-29b-3p 至大鼠前额叶皮质,免疫荧光显微镜观察 rAAV-miR-29b-3p 的感染效果,qRT-PCR 检测 rAAV-miR-29b-3p 表达水平。**结果** 成功包装的 rAAV-miR-29b-3p 经纯化后获得了高纯度的 rAAV-miR-29b-3p,qRT-PCR 检测 rAAV-miR-29b-3p 的病毒滴度达到 1.0×10^{12} vg/ml,经感染 21 d 后,脑组织前额叶皮质荧光表达明显,miR-29b-3p 表达水平明显提高。**结论** 构建的 rAAV-miR-29b-3p 可使大鼠前脑皮层 miR-29b-3p 高表达,为进一步研究 miR-29b-3p 的生物学功能提供了有效工具。

关键词: 腺相关病毒;miRNA-29b-3p;前额叶皮质;大鼠

中图分类号: R338;R-332

文献标识码: A

Construction of recombinant adeno-associated virus expressing miRNA-29b-3p and its expression in prefrontal cortex of rats*

Mao Li, Jian-guo Feng, Xiao-bin Wang, Qian-xiu Chen, Yun-qiang Wan
(Department of Anesthesiology, the Affiliated Hospital, Southwest Medical University,
Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract: Objective To obtain the recombinant adeno-associated virus expressing miRNA-29b-3p (rAAV-miRNA-29b-3p), and examine the infection effect and expression level of rAAV-miRNA-29b-3p in the prefrontal cortex of rats. **Methods** The pre-miRNA-29b-3p gene fragment was inserted into AAV expression plasmid to construct a recombinant AAV plasmid. The recombinant AAV plasmid, packaging plasmid and helper plasmid were co-transfected into HEK293 cells by Lipofiter™ for rAAV-miRNA-29b-3p packaging. The rAAV-miRNA-29b-3p was harvested from transfected HEK293 cells and purified by a resin column, and the titer of the rAAV-miRNA-29b-3p was tested by qRT-PCR. The rAAV-miRNA-29b-3p was injected to the prefrontal cortex of rats using stereotactic apparatus. The infection effect was observed under immunofluorescence microscope, the expression level of miRNA-29b-3p was detected by qRT-PCR. **Results** High titer of rAAV-miRNA-29b-3p was obtained after successful packaging. The rAAV-miRNA-29b-3p was purified, the virus titer reached 1.0×10^{12} vg/ml. Strong green fluorescence and high level of miRNA-29b-3p were detected in the infected prefrontal cortex after 21 days of

收稿日期:2016-12-24

* 基金项目:国家自然科学基金(No:81271478)

[通信作者] 王晓斌, E-mail: wangxiaobin67@163.com; Tel: 13708280087

infection. **Conclusions** The constructed rAAV-miR-29b-3p can greatly increase the expression level of miR-29b-3p in the prefrontal cortex of rats, which provides a useful tool for further study of the biological function of miR-29b-3p.

Keywords: adeno-associated virus; miR-29b-3p; prefrontal cortex; rat

MicroRNAs(miRNAs)是一类非编码蛋白质的单链小 RNA 分子,能编码调控基因的转录。近年来研究表明 miRNAs 与膀胱癌、乳腺癌、结肠腺癌等肿瘤^[1],抑郁症、精神分裂症、焦虑症等精神疾病^[2]的发生发展相关。前期研究结果发现氯胺酮抗抑郁作用可能通过 microRNA-29b-3p(miR-29b-3p)发挥作用(结果还未发表),然而具体机制不清楚。为了进一步研究 miR-29b-3p 的功能,克隆 miR-29b-3p 的基因片段以及高表达 miR-29b-3p 是重要的研究手段。重组腺相关病毒(recombination adeno-associated virus,rAAV)作为一种载体工具发挥着重要的作用。

本研究的目的是构建含有 miR-29b-3p 的重组腺相关病毒,并包装纯化病毒,然后通过脑立体定位仪注射 rAAV-miR-29b-3p 感染大鼠前额叶皮质,观察大鼠前额叶皮质感染效果及表达 miR-29b-3p 情况,为进一步研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

DNA 提取试剂盒、质粒小提中量试剂盒、总 RNA 提取试剂盒购自中国天根生化科技公司,逆转录试剂盒购自美国 Premega 公司,实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction,qRT-PCR)试剂盒购自德国 Qiagen 公司,Xba I 和 Age I 内切酶购自英国 NEB 公司,T4 连接酶购自日本 TaKaRa 公司,pfu 高保真酶购自中国天根生化科技公司,引物序列表内引物均购自生工生物工程上海有限公司, TOP10 感受态细胞购自中国康为世纪公司, pAAV-u6-IRES-hrGFP, pAAV-RC 和 pHelper 质粒购自英国 Cell Biolabs 公司,人胚肾细胞系 HEK293 cell、LipoFiter™ 转染试剂购自中国汉恒生物科技有限公司,DMEM 培养基、胎牛血清和胰酶购于美国 Hyclone 公司,滤膜滤器购自美国 Millipore 公司,SD 大鼠由西南医科大学实验动物中心提供。

1.2 前体 miR(pre-miR)的扩增

经查找 miRBase 基因组数据库 (<http://www.mirbase.org>),发现在大鼠基因组上有 3 个基因位点

可以编码 miR-29b-3p 的“茎环”结构,分别为 rno-miR-29b-1(MI0000864,4 号染色体 58100133 bp-58100053 bp)、rno-miR-29b-2(MI0000862,1 号染色体 39612388 bp-39612468 bp)和 rno-miR-29b-3(MI0031777,13 号染色体 118329450 bp-118329530 bp),本研究以 rno-miR-29b-1 的“茎环”结构为基础,正向延长 81 bp 以及反向延长 100 bp,即基因组定位片段为 1 号染色体 58100214 ~58099953 bp,作为 pre-miR-29b-3p 的基因片段。然后,选用雄性 SD 大鼠,正常饲养 1 周后,用 1%戊巴比妥 40 mg/kg 腹腔注射麻醉后断颈处死,取出脑组织两侧前额叶皮质于灭酶 EP 管,放入液氮罐中,转入 -80℃ 冰箱保存。本研究得到西南医科大学附属医院伦理委员会同意。将取得的前额叶皮质组织用 DNA 提取试剂盒提取全基因组 DNA,以基因组为模板,用 pre-miR-29b-3p 的特异性引物 rat-29-Age I -F 和 rat-29-Xba I -R(见表 1),PCR 扩增出 miR-29b-3p 的基因片段,PCR 反应程序:95℃ 5 min,95℃ 30 s,56℃ 30 s,72℃ 1 min,32 个循环,72℃ 10 min。

1.3 重组质粒构建

用 Xba I 和 Age I 内切酶同时酶切 1.2 中得到的 pre-miR-29b-3p 基因片段和 pAAV-U6-IRES-hrGFP 质粒,37℃ 酶切过夜,双酶切产物命名为:miR-29b-3p-DD,pAAV-U6-IRES-hrGFP-DD,T4 连接酶 16℃ 连接 60 min,将连接后的产物转化入 TOP10 感受态细胞中,37℃ 倒置培养 12~16 h,次日挑取单个菌落,挑取的菌落进行菌落 PCR,产物行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,观察目的条带,同时将挑取的菌落加入含有氨苄青霉素抗性的 25 ml LB 培养基,37℃ 摇菌过夜后,用高纯度质粒提取试剂盒,提取质粒,进行双酶切鉴定,1.2% 琼脂糖凝胶电泳,观察目的条带,将菌落 PCR 和双酶切鉴定正确的菌落,送华大基因(中国重庆)测序,经序列比对,结果正确的重组质粒命名为 pAAV-U6-miR-29b-3p-IRES-hrGFP。

1.4 rAAV 包装、纯化及滴度鉴定

HEK293 细胞用 DMEM 培养基加入 10% 胎牛血清在 5% 的二氧化碳孵箱中培养,胰酶消化 HEK293 细胞,将细胞接种于培养皿中,80%~90% 满即可进行转染。用 LipoFiter™ 转染试剂,将

表 1 引物序列表

反应程序	引物名称	具体序列
miR-29b-3p 荧光定量 PCR	rno-miR-29b-3p-qF	TgCggTAGCACCATTTgAAAT
	rno-miR-U6-qF	TgCgggTgcTCgCTTCggCAGC
	rno-miR-qR	CCAgTgCAgggTCCgAggT
miR-29b-3p PCR	rat-29-AgeI-F	atagcaccggTCACCTGCTGGATGAGGCCA
	rat-29-XbaI-R	gctctaga TGCTACTTGAGCAGGTTCT
逆转录 PCR	rno-miR-29b-3p-RT	gTcgTATCCAgTgCAgggTCCgAggTgCACTggATACgACAACACTgA
	rno-U6-RT	gTcgTATCCAgTgCAgggTCCgAggTATTCgCACTggATACgACAAAATATggAAC
病毒滴度荧光定量 PCR	qITR-F	CGGCCTCAGTGAGCGA
	qITR-R	GAACCCCTAGTGATG

pAAV-U6-miR-29b-3p-IRES-hrGFP 重组表达质粒、pAAV-RC 和 pHelper 共转染到 HEK293 细胞中, 转染 72 h 后即可包装得到重组腺相关病毒 rAAV-miR-29b-3p。收集所有细胞于 15 ml 离心管中并加入 300 μ l 的 PBS,液氮及 37℃水浴反复冻融 3 次,3 000 r/min 离心 5 min,收集病毒上清液,将病毒上清液于 0.45 μ m 滤膜过滤,树脂柱纯化后,最终得到纯化后的病毒约 200 μ l,于 -70℃保存,使用 qITR-F 和 qITR-R 引物(见表 1)进行 qRT-PCR 滴度鉴定,标准品的拷贝梯度为 10⁵、10⁶、10⁷、10⁸、10⁹ 和 10¹⁰,qRT-PCR 反应程序:95℃,10 min;40 个 PCR 循环[95℃,10 s,60℃,60 s(收集荧光)],根据 Ct 值(average)和对应的拷贝数,做 1 元 1 次函数曲线,并换算成拷贝数 10^x 及病毒滴度 vg/ml。rAAV 病毒滴度 =10^x × 40 000 vg/ml。

1.5 rAAV-miR-29b-3p 感染大鼠前额叶皮质

雄性 SD 大鼠 15 只,180 ~ 220 g,正常饲养 1 周后随机分为正常组 5 只:脑立体定位注射 0.9%生理盐水(NS);腺相关病毒实验组 5 只:脑立体注射 rAAV-miRNA-29b-3p 腺相关病毒;腺相关病毒对照组 5 只:脑立体注射携带 rAAV-GFP 腺相关病毒。主要操作步骤为:1%戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔注射麻醉大鼠,固定于脑立体定位仪上,以前囟为原点,根据大鼠脑立体定位图谱(Paxinos and Watson,2007)选定坐标,颅钻钻孔至脑膜见脑脊液流出,前额皮质坐标为:A/P+4.7 mm,M/L $\pm$ 2 mm,D/V-1mm,用 2 μ l 微量注射器吸取腺相关病毒 2 μ l,以 0.2 μ l/min 的速度注射 5 min,每侧注射 1 μ l,每次留针 10 min,缓慢出针,先行一侧注射,再按相同步骤行对侧注射,碘伏消毒切口,缝合皮肤,放回笼中继续饲养。21 d 后,用 1%戊巴比妥 40 mg/kg 腹腔注射麻醉后断颈处死,取出脑组织,一侧大鼠脑

前额叶皮质迅速冷冻切片,通过固定、核染色以及封片等处理后在荧光显微镜下观察荧光强度;另一侧大鼠脑前额叶皮质于灭酶 EP 管,放入液氮罐中,转入 -80℃冰箱保存。

1.6 qRT-PCR

使用总 RNA 提取试剂盒一步法提取各组前额叶皮质大脑组织的总 RNA,用 miR-29b-3p 的特异性逆转录引物 Rno-miR-29b-3p-RT(见表 1)逆转录生成 cDNA,U6 作为内参基因,其特异性逆转录引物为 Rno-U6-RT(见表 1)。将所有 cDNA 样品分别配置 Real-time PCR 10 μ l 反应体系,qRT-PCR 反应程序:95℃,10 min;40 个 PCR 循环[95℃,10 s,60℃,60 s(收集荧光)],扩增反应结束后,按 95℃,10 s;60℃,60 s;95℃,15 s,建立 PCR 产物的熔解曲线,并从 60℃缓慢加热到 99℃,以样品 miRNA-29b-3p 的特异引物 rno-miR-29b-3p-qF 和内参(rno-U6)的特异引物 rno-miR-U6-qR 及相同的 rno-miR-qR 引物(见表 1),分别进行 Real-time PCR 反应,数据采用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法进行分析。

1.7 免疫荧光

将冷冻切片 4%多聚甲醛固定 30 min,PBS 洗 2 次,每次 5 min,0.2% Triton-100 溶液作用 15 min,PBS 洗 2 次,每次 5 min,加 1%BSA 封闭液室温作用 30 min,PBS 洗 2 次,每次 5 min,DAPI 浓度 1:1 000 室温作用 5 min,PBS 洗 3 次,每次 5 min,封片,免疫荧光显微镜观察。

2 结果

2.1 pre-miR-29b-3p 扩增

根据对 miR-29b-3p“茎环”结构序列的分析显示 3 个不同的“茎环”结构rno-miR-29b-1、rno-miR-29b-2、rno-miR-29b-3与成熟 miR-29b-3p 比对具

有相同的成熟 miR-29b-3p 序列(见图 1A);构建的 pre-miR-29b-3p 基因片段约 280 bp, 红色序列为“茎环”结构, 红色序列中下划线的序列为成熟的 miR-29b-3p 的编码序列, 整个基因序列两端下划线部分为引物序列(见图 1B)。提取的大鼠前额叶皮质基因组经 PCR 扩增及纯化后经 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳, 在 250 bp 处上方可见明显条带(见图 2A), 与预期的约 300 bp 基因片段大小相符。

2.2 pAAV-U6-miR-29b-3p-IRES-hrGFP 质粒构建结果

PCR 目的基因产物与 pAAV-U6-IRES-hrGFP 载体质粒双酶切、连接后得到的重组质粒

miR-29b-3	CUUCUGGAAGCUGGUUUCACAUUGGCUUAGAUUUUCCAUUUUUAUUAUAGCACCAU
miR-29b-2	CUUCUGGAAGCUGGUUUCACAUUGGCUUAGAUUUUCCAUUUUUAUUAUAGCACCAU
miR-29b-1	CUUCAGGAAGCUGGUUUCAUUAGGUUUUAGAUUUUAAUAG-UGAUUGUCUAGCACCAU
miR-29b-3p	-----UAGCACCAU

miR-29b-3	UUGAAUUCAGUUUUAGGAG-
miR-29b-2	UUGAAUUCAGUUUUAGGAG-
miR-29b-1	UUGAAUUCAGUUUUAGGAG-
miR-29b-3p	UUGAAUUCAGUUU-----

A

pAAV-U6-miR-29b-3p-IRES-hrGFP(见图 2D), 转化后得到的 5 个菌落, 经 PCR 扩增、琼脂糖凝胶电泳后可见菌落编号为 U6-5 的菌落 250 bp 处上方有明显条带(见图 2B)。菌落 U6-5 提取出的质粒经 XbaI 和 AgeI 双酶切、琼脂糖电泳后, 在 5 500 bp 左右和 250 bp 上方有明显条带(见图 2C)。对菌落 U6-5 质粒上重组片段进行基因测序和比对, 比对结果与目的 pre-miR-29b-3p 基因序列完全一致(见图 2E)。

2.3 rAAV-miR-29b-3p 包装、纯化及滴度鉴定结果

根据 qRT-PCR 法测得得样品 Ct 值(见图 3A),

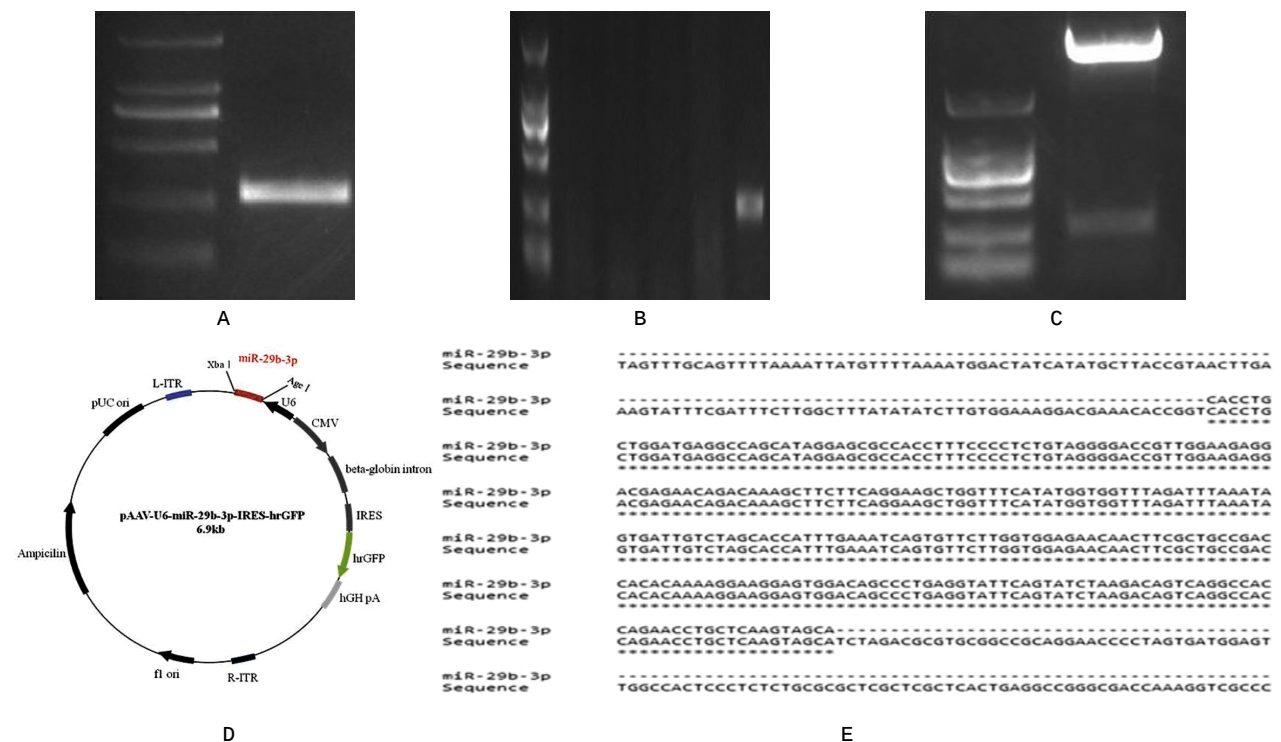
```

CACCTGCTGGATGAGGCCAGCATAGGAGCGCCACCTTTCCCTCTGTAGGG
GACCGTTGGAAGAGGACGAGAACAGACAAAGCTTCTTCAGGAAGCTGGTT
TCATATGGTGGTTTAGATTAAATAGTGATTGTCTAGCACCATTGAAATCAG
TGTTCTGGTGGAGAACAACTTCGCTGCCGACCACACAAAAGGAAGGAGT
GGACAGCCCTGAGGTATTGATCTAAGACAGTCAGGCCACCAGAACCTG
CTCAAGTAGCA
  
```

B

A: 3 个不同的“茎环”结构 rno-miR-29b-1、rno-miR-29b-2、rno-miR-29b-3 与成熟 miR-29b-3p 比对具有相同的成熟 miR-29b-3p 序列;
B: miR-29b-3p 的基因序列

图 1 pre-miR-29b-3p 扩增结果



A: 目的基因 miR-29b-3p PCR 扩增产物条带; B: 阳性菌落 PCR 鉴定 U6-5 菌落条带在 Marker 250 bp 上方; C: 阳性菌落提取的质粒经双酶切后可见 250 bp 上方与约 5 500 bp 两条带; D: 重组 pAAV-U6-miR-29b-3p-IRES-hrGFP 质粒(启动子 U6+ 目的基因: miRNA-29b-3p+ 酶切位点: Age I、Xba I + 抗性基因: 氨苄青霉素 + 报告基因: hrGFP); E: 菌落 U6-5 质粒序列与 miR-29b-3p 基因序列比对完全相同

图 2 pAAV-U6-miR-29b-3p-IRES-hrGFP 质粒构建结果

以每组 AAV 标准品的 Ct 值其对应拷贝数的对数做回归曲线,计算标准曲线的函数公式及 R^2 值,通过函数公式计算待测 AAV 样品对应的拷贝数对数,换算成拷贝数 10^x 及病毒滴度 vg/ml , 得到图 3B 标准曲线,计算 rAAV-miR-29b-3p 病毒滴度如下:rAAV-miR-29b-3p 滴度 $=10^{7.41} \times 40\ 000=1.0 \times 10^{12} \text{ vg/ml}$ 。

2.4 大鼠前额叶皮质 rAAV-miR-29b-3p 感染情况

大鼠前额叶皮质冷冻切片,通过固定、核染色以

及封片等处理后在荧光显微镜下观察到 rAAV-GFP 和 rAAV-miR-29b-3p 组绿色荧光表达明显,而正常组未见绿色荧光表达。见图 4。

2.5 rAAV-miR-29b-3p 感染的前额皮质 miR-29b-3p 表达

qRT-PCR 检测 rAAV-miR-29b-3p 感染的前额皮质 miR-29b-3p 相对表达量, 结果发现腺相关病毒实验组大鼠前额皮质 miR-29b-3p 表达水平较腺相关病毒对照组上调约 4 倍(见图 5)。

样品名称	CT1	CT2	CT3
10^{10}	4.48	4.29	4.39
10^9	7.65	7.42	7.54
10^8	10.68	10.73	10.71
10^7	14.15	14.42	14.29
10^6	17.68	17.81	17.75
miR-29b-3p	12.90	12.72	12.88

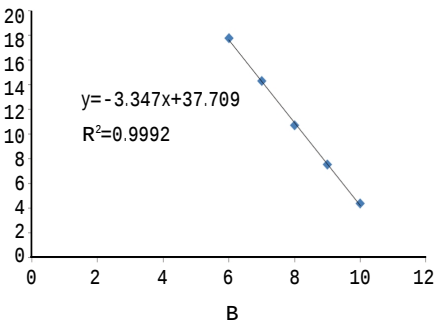
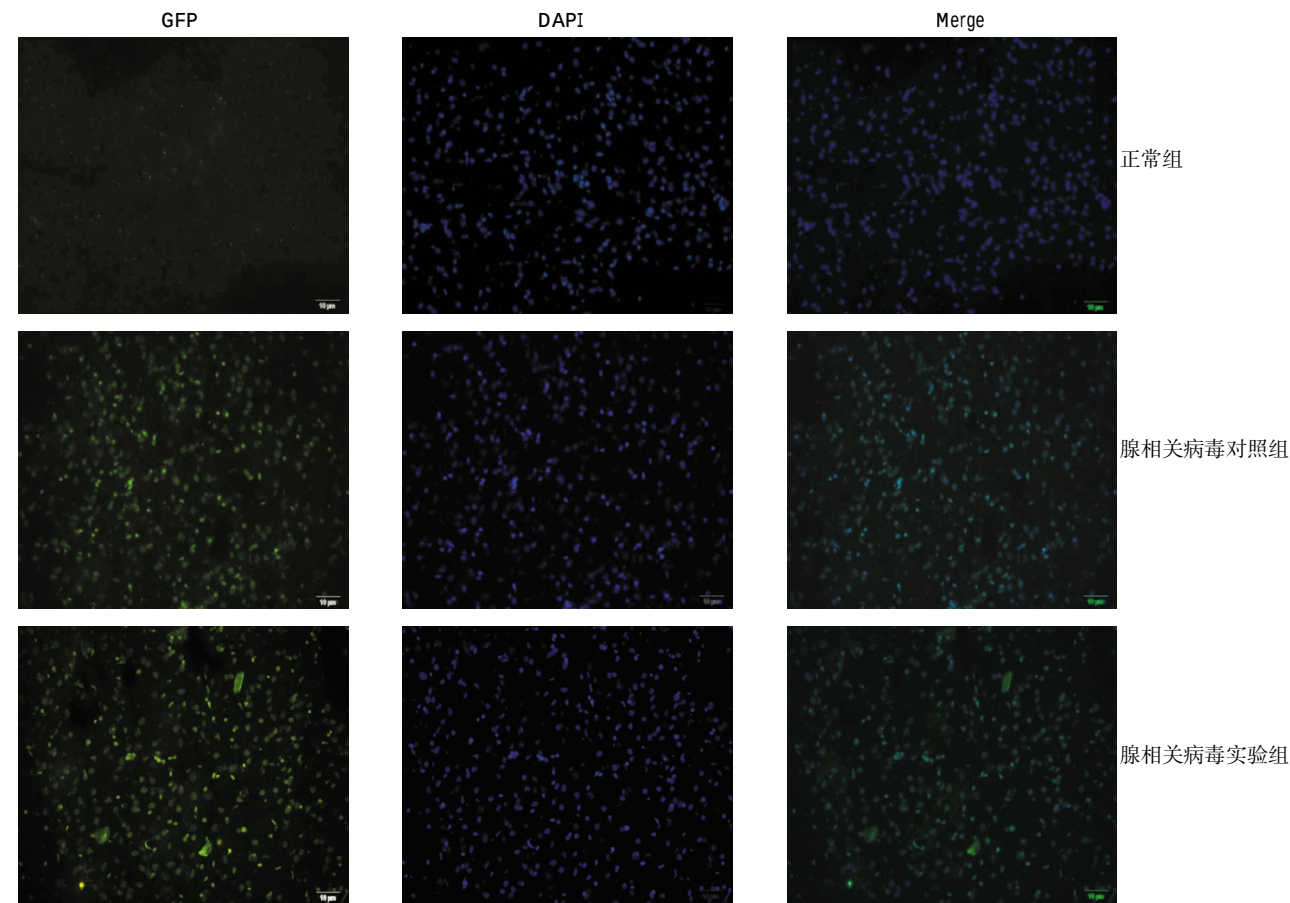
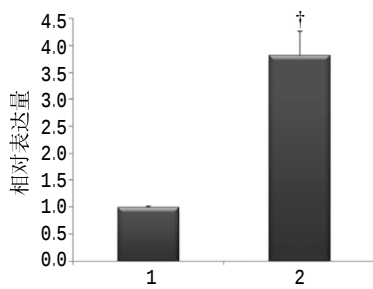


图 3 rAAV-miR-29b-3p 滴度鉴定



正常组:大鼠前额叶皮质组织未见绿色荧光;腺相关病毒对照组:大鼠前额叶皮质组织可观察到绿色荧光;腺相关病毒实验组:大鼠前额叶皮质组织可观察到绿色荧光

图 4 大鼠前额叶皮质 rAAV-miR-29b-3p 感染情况 (× 400)



1:腺相关病毒对照组;2:腺相关病毒实验组;†与两组比较, $P<0.05$

图 5 大鼠前额皮质 miR-29b-3p 相对表达量

3 讨论

抑郁症是一种慢性精神疾病,到 2030 年,将成为全球第一致残的疾病,严重影响患者生活质量,增加经济负担^[3]。虽然目前已进行了很多研究,但具体与抑郁症相关的细胞和分子机制仍不清楚。目前在抑郁症与 miRNA 的研究已经证实 miR 与突触可塑性障碍、神经发生、单核苷酸多态性、应激以及多种抗抑郁药相关^[4-7]。

与其他病毒相比,rAAV 具有低免疫原性^[8],与逆转录病毒或者慢病毒不一样,rAAV 不整合入宿主基因组^[9],还能快速使特定区域相关基因缺失^[10],因此 rAAV 比逆转录病毒或者慢病毒能更好研究基因缺失或者表达。rAAV 具有不同的血清型,目前人的血清型有 12 种^[11],不同人源血清型对脏器组织的亲和力不同,对脑组织高的血清型是 2、4、7~9、rh10,VINCENT^[12]已经证实 AAV2/9 比 AAV2/2、AAV2/5 更有效用于基因删除或者基因过表达,所以本研究中选择的血清型为 AAV2/9 型。随着 AAV 载体的不断发展完善,其在基因治疗中的应用也越来越广泛,目前 rAAV 相关的临床试验已经得到国际的广泛关注,AAV1、AAV2 携带 $\alpha 1$ 抗胰蛋白酶通过肌肉注射治疗 $\alpha 1$ 抗胰蛋白酶缺陷症处于临床 I、II 期;AAV2、AAVrh10 携带 CLN 直接颅内给药治疗神经元蜡样质脂褐质沉积病处于临床 I 期;AAV2 携带囊性纤维化跨膜传导调节蛋白 CFTR 支气管喷雾给药治疗囊性纤维化病临床 I、II 期(共完成 150 个病例);AAV2 携带 AADC、GAD、神经营养蛋白颅内给药治疗帕金森病(临床 I、II 期)等疾病^[13-14],并取得了较好的疗效。

本实验先根据 miRBase 数据库得到 pre-miR-29b-3p 基因片段大小约 280 bp。大鼠基因组中编码 miR-29b-3p“茎环”结构的基因位点有 3 个,理论上 3 个基因位点的“茎环”结构经过加工均可以形成成熟

的 miR-29b-3p。本研究选定了 miR-29b-1 的“茎环”结构作为扩增 pre-miR-29b-3p 的模板。提取大鼠的全基因组,PCR 特异性扩增出 miR-29b-3p 基因,由于基因片段上带有酶切位点,因此 miR-29b-3p 的基因大小约 300 bp 与目的条带相吻合。双酶切目的基因和载体质粒,连接转化后菌落 PCR,经琼脂糖凝胶电泳可以看到图 2B 中 U6-5 菌落条带在 250 bp 上方,与 miR-29b-3p 目的基因大小吻合,为了再次确认 U6-5 菌落是不是真阳性菌落,双酶切该菌落的质粒,可以看到 1 条在 250 bp 上方,1 条约 5 500 bp,250 bp 上方的条带是 miR-29b-3p 基因,5 500 bp 条带是质粒骨架,为了明确 U6-5 菌落质粒上的基因序列,测序比对结果与基因库的 miR-29b-3p 基因序列完全一致,说明 pre-miR-29b-3p 构建和重组的质粒是成功的。

重组的质粒、辅助质粒、包装质粒,3 质粒共转染 HEK293 细胞,纯化以后的病毒滴度达到了 1.0×10^{12} vg/ml,高于感染大鼠脑组织的最低浓度是 1.0×10^9 vg/ml,在理想的浓度 $1.0 \times 10^{11} \sim 1.0 \times 10^{13}$ vg/ml 之间^[15],适用于大鼠脑组织的感染。重组的腺相关病毒注射大鼠前额叶皮质 21 d 后可以看到明显的绿色荧光表达,说明载体质粒上的报告基因 hrGFP 已经表达绿色荧光蛋白,但是为了确定携带的 pre-miR-29b-3p 是否可以加工成成熟的 miR-29b-3p 及检测其表达水平,通过 qRT-PCR 检测到 miR-29b-3p 的表达水平,发现 miR-29b-3p 表达增强,表明构建的腺相关病毒成功感染脑组织并使 miR-29b-3p 表达增加。

目前在精神疾病方面通过 AAV 载体的基因治疗已经有很多报道,BAI^[16]研究证明 AAV-proBDNF 感染大鼠海马可以上调抑郁样大鼠海马 BDNF 的水平,MARONGIU^[17]通过 AAV-sh-p11 阻断 P11 基因的表达治疗帕金森大鼠,但是没有腺相关病毒携带 miR 基因治疗抑郁症的相关文献,本研究制备的 rAAV-miR-29b-3p 感染抑郁症模型大鼠前额叶皮质后,抑郁症大鼠行为学出现改变(数据未显示),这将为进一步研究 miR-29b-3p 的生理学功能以及抑郁症的基因治疗提供有效的手段与方法。

参 考 文 献:

- [1] PILETIC K, KUNEJ T. MicroRNA epigenetic signatures in human disease[J]. Archives of Toxicology, 2016, 90(10): 2405-2419.
- [2] ISSLER O, CHEN A. Determining the role of microRNAs in

- psychiatric disorders[J]. *Nature Reviews Neuroscience*, 2015, 16 (4): 201-212.
- [3] MATHERS C D, EZZATI M, LOPEZ A D. Measuring the burden of neglected tropical diseases: the global burden of disease framework [J]. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2007, 1 (2): e114.
- [4] YANG X, YANG Q, WANG X, et al. MicroRNA expression profile and functional analysis reveal that miR-206 is a critical novel gene for the expression of BDNF induced by ketamine[J]. *Neuromolecular Med*, 2014, 16(3): 594-605.
- [5] MOUILLET-RICHARD S, BAUDRY A, LAUNAY J M, et al. MicroRNAs and depression[J]. *Neurobiology of Disease*, 2012, 46 (2): 272-278.
- [6] DWIVEDI Y. Evidence demonstrating role of microRNAs in the etiopathology of major depression[J]. *J Chem Neuroanat*, 2011, 42 (2): 142-156.
- [7] WANG X. Antidepressant effect of the first electroconvulsive therapy with ketamine and/or propofol: response[J]. *the Journal of ECT*, 2013, 29(2): 149.
- [8] BURGER C, GORBATYUK O S, VELARDO M J, et al. Recombinant AAV viral vectors pseudotyped with viral capsids from serotypes 1, 2, and 5 display differential efficiency and cell tropism after delivery to different regions of the central nervous system[J]. *Molecular Therapy: the Journal of the American Society of Gene Therapy*, 2004, 10(2): 302-317.
- [9] LAI C M, LAI Y K, RAKOCZY P E. Adenovirus and adeno-associated virus vectors[J]. *Dna & Cell Biology*, 2003, 21(12): 895-913.
- [10] AURICCHIO A, HILDINGER M, O'CONNOR E, et al. Isolation of highly infectious and pure adeno-associated virus type 2 vectors with a single-step gravity-flow column[J]. *Hum Gene Ther*, 2001, 12(1): 71-76.
- [11] DAYA S, BERNIS K I. Gene therapy using adeno-associated virus vectors[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2008, 21(4): 583-593.
- [12] VINCENT M, GAO G, JACOBSON L. Comparison of the efficacy of five adeno-associated virus vectors for transducing dorsal raphe nucleus cells in the mouse[J]. *J Neurosci Methods*, 2014, 235: 189-192.
- [13] GRIEGER J C, SAMULSKI R J. Adeno-associated virus as a gene therapy vector: vector development, production and clinical applications[J]. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2005, 99: 119-145.
- [14] MINGOZZI F, HIGH K A. Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2011, 12(5): 341-355.
- [15] HUANG Z J, TANIGUCHI H, HE M, et al. Cre-dependent adeno-associated virus preparation and delivery for labeling neurons in the mouse brain[J]. *Cold Spring Harbor protocols*, 2014, 2014(2): 190-194.
- [16] BAI Y Y, RUAN C S, YANG C R, et al. Probdnf signaling regulates depression-like behaviors in rodents under chronic stress [J]. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 2016, 41 (12): 2882-2892.
- [17] MARONGIU R, ARANGO-LIEVANO M, FRANCARDO V, et al. Gene therapy blockade of dorsal striatal p11 improves motor function and dyskinesia in parkinsonian mice[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(5): 1423-1428.

(张蕾 编辑)