

## 一种活性缺陷型小鼠端粒酶催化亚基过表达慢病毒载体的构建及功能初步测定

刘梦颖, 韩舟, 吴海银, 陈晨, 沈芯如, 周海辉, 周其冈\*, 朱东亚\*

(南京医科大学药学院药理学系, 江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的:构建含活性缺陷型小鼠端粒酶催化亚基(去除氨基酸702~712的mTERT,命名为mTERT $\Delta$ )基因的慢病毒载体,检测其表达和功能。方法:从先前构建的表达mTERT全长的pDC315-EGFP-mTERT质粒中,通过缺失突变PCR扩增小鼠mTERT $\Delta$ 基因,构建真核表达载体GV287-EGFP/mTERT $\Delta$ 。鉴定正确后将目的基因克隆入慢病毒载体pGC-LV,得重组载体pGC-LV/mTERT $\Delta$ -EGFP,采用Lipofectamine2000将其转染293T细胞,包装慢病毒颗粒LV-mTERT $\Delta$ -EGFP后感染神经干细胞和原代神经元,TRAP-PCR方法检测端粒酶活性,荧光显微镜观察目的片段表达和细胞增殖情况。结果:成功构建TERT $\Delta$ 基因片段,测序证明重组慢病毒载体pGC-LV/mTERT $\Delta$ -EGFP构建成功。包装慢病毒颗粒LV-mTERT $\Delta$ -EGFP可以感染神经干细胞和神经元,端粒酶活性测试证明目的蛋白的端粒酶催化活性缺陷,抑制神经干细胞增殖,抑制内源性mTERT功能。结论:慢病毒载体LV-mTERT-EGFP构建成功,可以表达无活性mTERT片段。

**[关键词]** 端粒酶;mTERT;慢病毒;神经干细胞;EGFP

**[中图分类号]** R785

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2014)06-691-08

**doi:**10.7655/NYDXBNS20140601

## Construction and preliminary function determination of lentiviral vector overexpressing activity-defective mTERT in mice

Liu Mengying, Han Zhou, Wu Haiyin, Chen Chen, Shen Xinru, Zhou Haihui, Zhou Qigang\*, Zhu Dongya\*

(Department of Pharmacology, Pharmacy College, NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:**To construct lentiviral vector carrying activity-defective mTERT (deleting amino acid 702-712, named mTERT $\Delta$ ) and to detect its expression and function. **Methods:**Mice mTERT $\Delta$  gene was amplified by our previous constructed plasmid pDC315-EGFP-mTERT carrying the whole gene encoding mTERT by deletion mutant PCR. Then, eukaryotic expression vector of GV287-EGFP/mTERT $\Delta$  was constructed. After DNA sequence analysis, mTERT $\Delta$  was cloned into lentiviral vector pGC-LV to construct recombinant vector pGC-LV/mTERT $\Delta$ -EGFP. pGC-LV/mTERT $\Delta$ -EGFP was transfected into 293T cells by Lipofectamine 2000 to package lentiviral particle LV-mTERT $\Delta$ -EGFP. The particles were transfected into neuronal stem cells and primary neurons. TRAP-PCR was performed to detect telomerase activity, and fluorescence microscopy was performed to observe fragment expression and cell proliferation. **Results:**TERT $\Delta$  gene fragment was successfully constructed, and the analysis of DNA sequence proved that the recombinant lentiviral vector pGC-LV/mTERT $\Delta$ -EGFP was successfully constructed. Package of lentiviral particle LV-mTERT $\Delta$ -EGFP were transfected into neuronal stem cells and primary neurons. The expressed mTERT $\Delta$  detected by telomerase activity test was activity defective, and inhibited neural stem cell proliferation and endogenous mTERT function. **Conclusion:**The lentiviral vector of LV-mTERT $\Delta$ -EGFP was constructed successfully and infected cells could express activity-defective mTERT.

**[Key words]** telomerase;mTERT;lentivirus;neural stem cell;EGFP

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(06):691-698]

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(81370033);国家自然科学基金重点项目(81030023)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: qigangzhou@gmail.com; dyzhu@njmu.edu.cn

端粒酶(telomerase)是位于端粒末端的一种核糖核蛋白逆转录酶,通过发挥逆转录酶活性催化生成端粒<sup>[1-3]</sup>。端粒酶的发现解决了长期困惑科学界的“末端复制问题”,其3名发现者于2009年获得诺贝尔医学奖。端粒酶主要由自带RNA模板(telomerase RNA,TERC)、蛋白质催化亚基(telomerase reverse transcriptase,TERT)和端粒酶相关蛋白构成<sup>[4]</sup>。现在研究表明端粒酶能够影响干细胞的增殖,与衰老、肿瘤、角化症、抑郁症等众多疾病关联密切<sup>[5]</sup>。其中,由于TERT发挥催化活性,是端粒酶发挥功能的关键亚基<sup>[6]</sup>。肿瘤组织TERT表达异常升高,过表达TERT能够导致肿瘤发生<sup>[6-7]</sup>。过表达TERT能够逆转衰老的病理改变<sup>[8]</sup>。同时本课题组研究发现抑郁症小鼠成年海马端粒酶表达降低,过表达TERT能够发挥抗抑郁作用<sup>[9]</sup>。由于端粒酶主要功能是催化延长端粒,但是近期研究表明TERT的某些作用并不依赖于其活性<sup>[10]</sup>,暗示端粒酶发挥功能的重大机制仍然没有被揭示。虽然已有TERT抑制剂齐多夫定(zidovudine,AZT),但是AZT除了作用于端粒酶外,还具有其他效应。为了研究TERT发挥作用的机制,设想一种活性缺陷型(切除了TERT活性的关键氨基酸)端粒酶催化亚基慢病毒过表达载体,配合本课题组先前构建的全长TERT表达载体,来研究端粒酶的作用机制。

研究发现将TERT706位丙氨酸突变为天冬氨酸,会导致TERT的催化活性完全缺失<sup>[11]</sup>。运用这个原理,Ishikawa课题组构建了TERT基因敲除小鼠<sup>[12]</sup>。本课题组先前已经成功构建了表达mTERT全长的腺病毒载体<sup>[13]</sup>,并研究了TERT的相关功能<sup>[9]</sup>。设想在此基础上进一步设计剔除TERT中编码706位丙氨酸的基因,从而构建一种活性缺陷型mTERT载体。通过缺失突变PCR和克隆技术,本研究成功构建了一种活性缺陷型小鼠端粒酶催化亚基过表达慢病毒载体(LV-mTERTΔ-EGFP)并初步鉴定了其功能,为研究TERT的功能和机制提供了新工具。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

DMEM/F12、神经基础培养基(neurobasal media)、B27购自美国Gibco公司,TRIzol、脂质体转染试剂盒Lipofectamine 2000购自美国Invitrogen公司,2×PCR MasterMix、DNA Marker购自北京天根生化科技有限公司,琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒、DNA质粒提取试剂盒购自美国Axygen公司,T4

DNA连接酶、限制性核酸内切酶EcoR I、BamH I、Age I购自美国NEB公司,质粒pIRES2-EGFP为江苏省中医药研究院惠赠,pGC-LV载体购自上海吉凯基因化学技术有限公司,pDC315-EGFP-mTERT购自上海吉凯基因化学技术有限公司,其他试剂均为分析纯。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 真核表达载体GV287-EGFP/TERTΔ的构建

本课题组先前已经构建了小鼠TERT全长基因的过表达质粒pDC315-EGFP-mTERT<sup>[13]</sup>(用于包装病毒AD-mTERT-EGFP)。根据pDC315-EGFP-mTERT中TERT基因,设计1对引入碱基缺失突变引物,通过缺失突变PCR,剪切删除mTERT全长基因中编码702~712氨基酸的碱基序列,目的基因长为3410 bp,引物的5'端分别引入Age I和BamH I酶切位点,上游引物:5'-GAGGATCCCCGGGTACCGGTCCGCCACCATGACCCGCGCTCCTCGTTGCC-3';下游引物:5'-TCCTTGTAGTCCATACCGTCCAAAATGGTCTGAAAGTCTGTGCTTAG-3'。反应条件如下:94℃预变性5 min;94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 2 min循环30次;72℃延伸10 min,4℃保持。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳观察,DNA胶回收试剂盒回收。载体GV287-EGFP与目的基因用Age I和BamH I双酶切,电泳切胶回收目的片段。载体GV287-EGFP的元件顺序是Ubi-MCS-3FLAG-SV40-EGFP,重组质粒转染细胞,表达的蛋白将会带有FLAG标签用于检测。

#### 1.2.2 重组质粒pGC-LV/mTERTΔ-EGFP的构建

将GV287-EGFP/TERTΔ进行Age I和BamH I酶双酶切,同时慢病毒载体pGC-LV(含绿色荧光蛋白EGFP基因)也进行Age I和BamH I双酶切,切胶回收后用T4连接酶连接,连接产物转化感受态细胞,经氨苄青霉素抗性平板筛选阳性克隆,提取质粒。

#### 1.2.3 重组质粒PCR鉴定结果

PCR产物交换入线性化表达载体,针对编码氨基酸702~712基因外围设计引物如下:KL6740-P6:5'-TGCGCTTCTGAGTATGG-3';FLAG-R-2:5'-CCTTATAGTCCTTATCATCGTC-3'。阳性转化子PCR扩增产物大小785 bp。反应条件如下:94℃预变性5 min;94℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 30 s,循环30次;72℃延伸6 min。

#### 1.2.4 慢病毒载体LV-TERTΔ-EGFP的包装和滴度测定

将慢病毒颗粒的重组病毒质粒和2种辅助包装原件载体质粒(pHelper 1.0和pHelper 2.0载体)分别进行高纯度无内毒素抽提,运用Lipofectamine 2000共转染293T细胞,转染后8h更换为完全培养基,培养48h后,收集富含慢病毒颗粒的细胞上清液,对其浓缩后得到高滴度的慢病毒浓缩液,在293T细胞中采用逐孔稀释法测定并标定病毒滴度。浓缩方法如下:每100 ml上清加入50 ml PEG8000(20% PEG8000,2.5 mmol/L NaCl),冰上1 h沉淀病毒。12 000 r/min离心上述混合物20 min,弃上清,将沉淀物悬浮在10 ml密度为1.10 g/ml的CsCl溶液中(溶剂为20 mmol/L Tris-HCl,pH8.0)4℃7 000 r/min离心5 min,收集病毒悬浮液。CsCl梯度的制备,加入2.0 ml的CsCl(密度1.40 g/ml,溶剂同上),再加入3.0 ml密度为1.30 g/ml的CsCl溶液。再加入5 ml的病毒悬浮液。20 000 r/min,室温离心2 h。收集密度在1.30~1.40 g/ml之间的病毒条带至透析袋中,透析袋预先用10 mmol/L的EDTA-Na<sub>2</sub>煮沸10 min。在透析缓冲液(50 g蔗糖、10 ml 1 mol/L pH为8.0的Tris-HCl液、2 ml 1 mol/L MgCl<sub>2</sub>溶液定容至1 000 ml)中,4℃透析过夜,中间换1次透析液,收集病毒。

### 1.2.5 TERTΔ表达检测

从转染GV287-EGFP/TERTΔ的293T细胞中提取蛋白,制备样品。蛋白上样量为20 μg。10% SDS-PAGE分离胶电泳,湿转300 mA恒流转膜2 h,封闭,Flag一抗过夜(F1804,1:3 000,Sigma公司,美国),二抗室温2 h(sc-2005,1:4 000,Santa Cruz公司,美国),ECL法结合X线片显色体系曝光。从感染LV-TERTΔ-EGFP的神经元中提取蛋白,制备样品,选择针对氨基酸693~722位点的特异性mTERT一抗(API1410e,Abgent公司,美国)检测,Western blot步骤同上。

### 1.2.6 慢病毒转染神经干细胞和原代神经元

原代培养神经元和神经干细胞。神经元培养至第14天,LV-TERTΔ-EGFP感染神经元,4 d后显微镜下观察荧光,并拍照。原代神经干细胞培养接种时LV-TERTΔ-EGFP感染,培养4 d后观察荧光表达和增殖情况。

### 1.2.7 TERT活性检测

LV-TERTΔ-EGFP感染的细胞加200 μl裂解液,冰上裂解30 min,4℃,12 000 r/min离心20 min,吸取上清运用美国Millipore公司的端粒酶活性测试试剂盒进行测试。其中PCR条件:预热30℃30 min,

94℃10 min,加0.4 μl Taq酶。PCR反应条件:94℃30 s,59℃30 s,33个循环,72℃7 min。

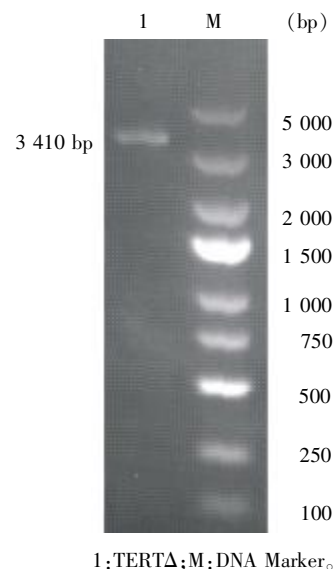
### 1.2.8 立体定位注射

小鼠麻醉后固定于手术台,以前囟为参照点,定位海马齿状回的位置(前后-0.2 cm,左右±0.15 cm,上下-0.22 cm),进针后缓慢注射药物,留置3 min后拔针,缝合,将小鼠返回原笼饲养。

## 2 结果

### 2.1 RT-PCR扩增目的基因

PCR扩增产物的1%琼脂糖凝胶电泳结果显示扩增出的目的基因片段长约3 410 bp(图1),与预计相符。



1:TERTΔ;M:DNA Marker。

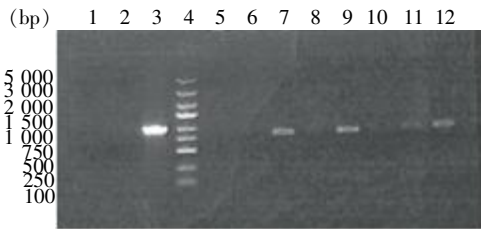
图1 RT-PCR扩增产物的电泳结果

Figure 1 Electrophoretic result of RT-PCR amplification products

### 2.2 真核表达载体GV287-EGFP/mTERTΔ的PCR和Western blot鉴定

由于构建的mTERTΔ基因全长比mTERT基因全长只小约30 bp,酶切不能鉴定mTERTΔ,因此仅采取设计引物PCR鉴定。给阳性克隆随机编号,并挑取1~8号单菌落提取质粒。针对编码包含702~712位氨基酸的基因序列设计引物,引物设计在该段序列外围。当去除编码包含702~712位氨基酸的基因后,PCR产物大小应当是785 bp,没有成功去除该段序列的目的基因长度应当稍大于785 bp。电泳后3、5、7、8号克隆都得到了长约785 bp DNA片段,其中3号克隆(lane7)与目的基因大小一致,5、7、8号克隆基因产物都稍大于785 bp(图2)。因此挑取3号克隆进行基因测序,结果表明重组质粒中

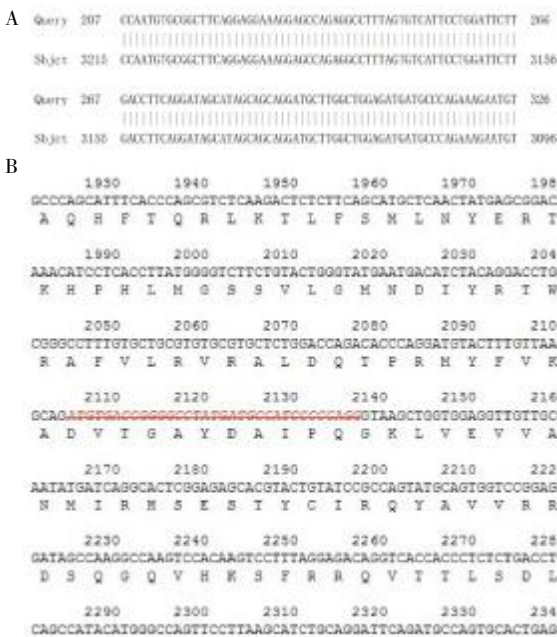
TERT $\Delta$  的 DNA 序列与从基因库中检索到的 mTERT 序列一致,其中编码 702~712 位氨基酸的基因序列丢失,且读框正确(图 3A)。通过序列比对表明,编码 702~712 氨基酸(DVTGAYDAIPQ)的基因序列丢失,从而证实了真核表达载体 GV287-EGFP/mTERT $\Delta$  已成功构建(图 3B)。



1: 阴性对照(ddH<sub>2</sub>O); 2: 阴性对照(空载体自连对照); 3: 阳性对照(GAPDH); 4: DNA Marker; 5~12: 1~8 号克隆 PCR 结果。

图 2 GV287-EGFP/mTERT $\Delta$  的 PCR 鉴定

Figure 2 PCR analysis of GV287-EGFP/mTERT $\Delta$



A: 测序结果比对(部分); B: 目的基因全序列分析表明编码 702~712 氨基酸(DVTGAYDAIPQ)的基因序列缺失(红色部分)。

图 3 GV287-EGFP/mTERT $\Delta$  的测序分析

Figure 3 Result of sequencing of GV287-EGFP/mTERT $\Delta$

### 2.3 真核载体转染 293T 细胞后的荧光检测

目的基因 mTERT $\Delta$  融合 EGFP 共同表达。GV287-EGFP/mTERT $\Delta$  转染 293T 细胞,转染后 24 h 可见荧光表达,转染效率高,荧光强度高(图 4)。

### 2.4 真核载体转染 293T 细胞后 Western blot 检测

GV287-EGFP/mTERT $\Delta$  转染 293T 细胞,24 h 后提取细胞蛋白运用抗 FLAG 一抗进行 Western blot 检测。由于该载体含有编码 FLAG 的序列,所以

可以用 FLAG 来反映目的蛋白的表达情况。结果显示无转染组无条带,GV287-EGFP/mTERT $\Delta$  转染组可以观察到 126 000 附近有特征条带,其大小和目的基因融合蛋白相吻合(图 5)。阳性参照显示 FLAG 位置。该质粒用 FLAG 抗体检测到目的条带,虽然有少许杂带,但是过表达目的蛋白显著。

### 2.5 病毒滴度测定结果

包装慢病毒颗粒,命名为 LV-mTERT $\Delta$ -EGFP。采用逐孔稀释法测定滴度。荧光显微镜下观察带有荧光的细胞数,得到慢病毒滴度为  $2.8 \times 10^8$  PFU/ml。将 LV-mTERT $\Delta$ -EGFP 感染 293T 细胞验证感染效率(图 6)。

### 2.6 感染神经干细胞、原代神经元及成年海马后的荧光检测

将 LV-mTERT $\Delta$ -EGFP 感染具有增殖能力的神经干细胞,3 d 后荧光观察可见病毒载体感染神经干细胞效果良好。将 LV-mTERT $\Delta$ -EGFP 感染不具有增殖能力的原代神经元(培养第 10 天),4 d 后观察病毒载体感染神经元效果良好。将病毒载体立体定位注射到成年海马的齿状回,4 d 后灌注切片观察,病毒载体感染成年海马齿状回细胞良好(图 7),这些结果表明 LV-mTERT $\Delta$ -EGFP 具有较好的应用效果。

### 2.7 LV-mTERT $\Delta$ -EGFP 感染海马 Western blot 检测

由于成熟神经元不表达 TERT,因此利用原代神经元培养来验证病毒载体是否表达正确的蛋白。将 LV-mTERT $\Delta$ -EGFP 感染发育成熟的神经元(原代培养 14 d),同时将先前构建的表达全长 mTERT 的 AD-mTERT-EGFP 作为阳性对照感染神经元。4 d 后取蛋白样本进行 Western blot 检测,GFP 结果显示两种病毒感染的神经元都表达了 GFP 蛋白(图 8),说明病毒感染表达良好。运用针对氨基酸 693~722 位点的特异性 mTERT 一抗检测 mTERT 表达。结果显示,AD-mTERT-EGFP 感染的神经元能够检测到 mTERT 片段,说明神经元过表达了 mTERT,但是 LV-mTERT $\Delta$ -EGFP 感染的神经元无法检测到条带(图 8),说明该病毒感染的神经元表达的 mTERT 不含有氨基酸 693~722 中的某些片段,侧面证明 LV-mTERT $\Delta$ -EGFP 能够表达剪切型的 mTERT (即 mTERT $\Delta$ ),而不能表达全长 mTERT。

### 2.8 LV-mTERT $\Delta$ -EGFP 转染后端粒酶活性检测及功能

为了验证 LV-mTERT $\Delta$ -EGFP 感染细胞后表达的 mTERT $\Delta$  是否失去端粒酶的催化活性,我们将 LV-mTERT $\Delta$ -EGFP 分别感染神经干细胞和神经元,

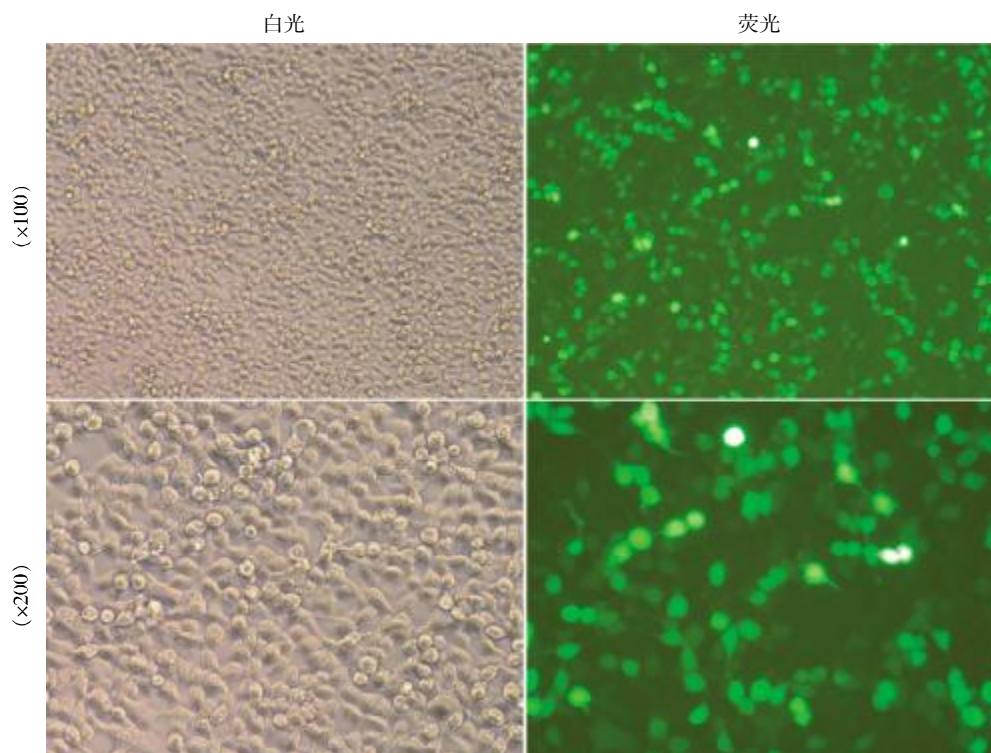
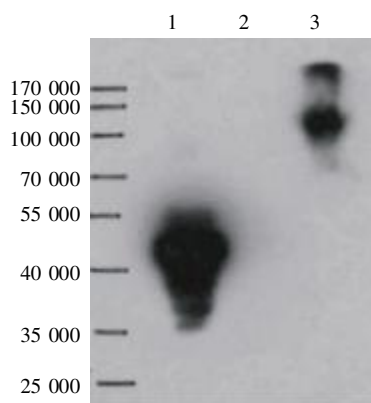


图 4 荧光检测 GV287-EGFP/mTERT $\Delta$  转染 293T 细胞

Figure 4 Fluorescence analysis of GV287-EGFP/mTERT $\Delta$  transfected into 293T cells



1:阳性参照;2:无转染组;3:GV287-EGFP/mTERT $\Delta$ 组。

图 5 Western blot 检测 GV287-EGFP/mTERT $\Delta$  转染 293T 细胞

Figure 5 Western blot analysis of GV287-EGFP/mTERT $\Delta$  transfected into 293T cells

运用经典的 TRAP-PCR 方法检测端粒酶活性。结果显示, LV-mTERT $\Delta$ -EGFP 感染的神经元没有检测到端粒酶活性(图 9A、B),表明 mTERT $\Delta$  不具有催化活性。同时, LV-mTERT $\Delta$ -EGFP 感染神经干细胞后显著降低神经干细胞中的端粒酶活性,可能是由于 mTERT $\Delta$  的表达竞争性地抑制了内源性有活性的 mTERT 的表达。为了验证无活性 mTERT $\Delta$  片段对神经干细胞增殖功能的影响,将 LV-mTERT $\Delta$ -EGFP

和 LV-EGFP(对照)感染神经干细胞,4 d 后发现与对照组比较, LV-mTERT $\Delta$ -EGFP 感染组神经干细胞球的数量和大小均有下降(图 9C、D,  $n = 3$ ),表明 mTERT $\Delta$  不仅不能促进神经干细胞增殖,反而能够抑制其增殖。这个结果提示 LV-mTERT $\Delta$ -EGFP 不仅可以作为研究 TERT 的工具,同时具有作为针对 TERT 靶点的生物治疗价值。

### 3 讨论

端粒酶与各种肿瘤发生、生长、治疗密切相关,同时对于体内各种干细胞的功能维持极其重要<sup>[5,14]</sup>。端粒酶介导各种干细胞(包括肿瘤干细胞)增殖能力的机制仍不明确。TERT 是端粒酶维持催化活性的关键亚基,但是 TERT 的功能机制及端粒酶是否依赖于其活性并不清楚<sup>[15]</sup>。探索这个问题对于了解端粒酶作用的根本机制具有重要意义。本研究构建了 1 种活性缺陷型小鼠端粒酶催化亚基过表达慢病毒载体(LV-mTERT $\Delta$ -EGFP),能够表达剪切型的 mTERT(删除氨基酸 702~712),经鉴定无催化活性。同时发现 LV-mTERT $\Delta$ -EGFP 具有抑制内源性 mTERT 的作用,为 LV-mTERT $\Delta$ -EGFP 用于端粒酶相关疾病的基因治疗提供了理论基础。

端粒酶基因外显子  $\gamma$  编码基序 A 中的 1 段,包

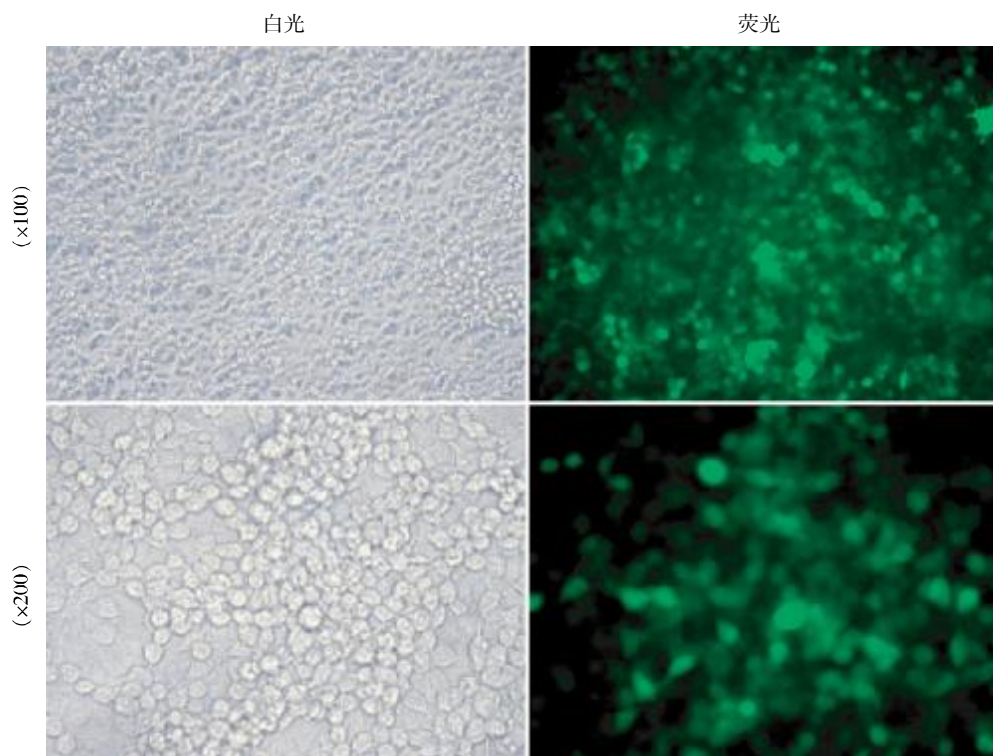
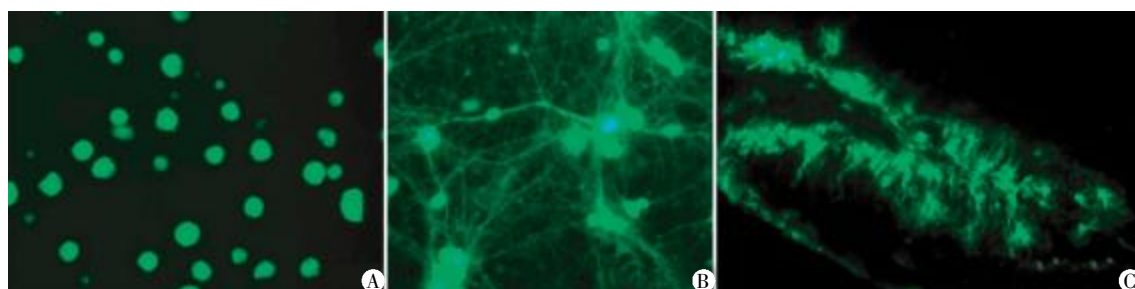


图 6 荧光检测 LV-mTERTΔ-EGFP 感染 293T 细胞

Figure 6 Fluorescence analysis of LV-mTERTΔ-EGFP transfected into 293T cells



A: 感染神经干细胞(x200); B: 感染神经元(x200); C: 感染成年海马齿状回区细胞(x100)。

图 7 荧光检测 LV-mTERTΔ-EGFP 感染神经细胞

Figure 7 Fluorescence analysis of LV-mTERTΔ-EGFP transfected into nerve cells

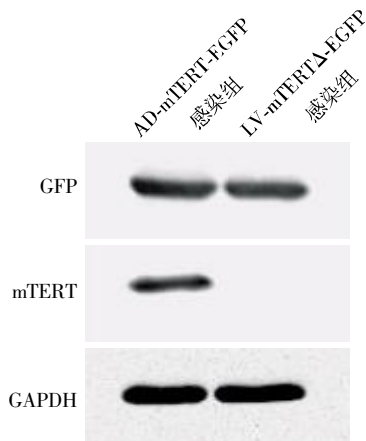
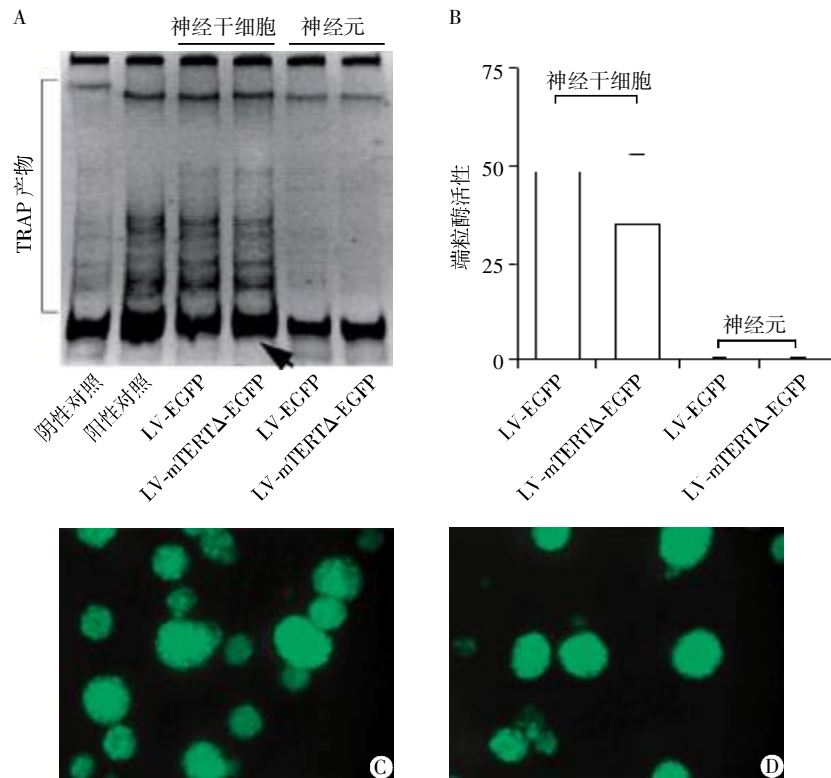


图 8 Western blot 检测 LV-mTERTΔ-EGFP 感染神经元

Figure 8 Western blot analysis of LV-mTERTΔ-EGFP transfected into neurons

括氨基酸(701~753),其被证实对于端粒酶催化活性中心构象的形成具有关键作用<sup>[12]</sup>。后来进一步证实,氨基酸 706(天冬氨酸)在其中发挥关键作用,氨基酸 706 单位点基因突变能够导致端粒酶活性完全丧失<sup>[11-12]</sup>,并且该位点在不同种属之间(人、大鼠、小鼠)高度保守。本研究在先前构建的 mTERT 全长真核载体的基础上<sup>[13]</sup>,设计引物进行缺失突变 PCR,从而产生编码 mTERTΔ(删除氨基酸 702~712)的新序列,通过重组构建产生了 LV-mTERTΔ-EGFP 载体。前人研究 TERT 的功能,主要通过产生全身性 TERT 敲除小鼠来实现,缺乏特异性。本研究构建的重组载体中 mTERTΔ 删除的氨基酸较少(只有 11 个),保留绝大部分的 TERT 原始属性,但完全无端粒酶活



A:端粒酶活性检测代表性图片,箭头表明 LV-mTERTΔ-EGFP 组上样量过大,导致梯形条带与对照组相似(实际下降);B:端粒酶活性数值 ( $n = 4$ );C:对照组 LV-EGFP 感染的神经干细胞( $\times 200$ );D:LV-mTERTΔ-EGFP 感染的神经干细胞( $\times 200$ )。

图 9 端粒酶活性检测和神经干细胞增殖

Figure 9 Detection of telomerase activity and proliferation of NSC

性,具有良好的感染效率、表达效率和特异性。将 LV-mTERTΔ-EGFP 注射到活体内研究某一组织,与基因敲除小鼠相结合,能够更加深入地研究端粒酶功能。

本研究中我们发现 LV-mTERTΔ-EGFP 抑制内源性端粒酶的催化活性(图 9A、B),同时对神经干细胞增殖的影响与过表达 mTERT 相反。由于 mTERTΔ 仅比 mTERT 少 11 个氨基酸,因此 mTERTΔ 的过表达可能抑制了内源性 mTERT 的表达。该结果提示 LV-mTERTΔ-EGFP 可能作为基因治疗的载体对肿瘤等 TERT 过表达的疾病进行治疗,我们将应用 LV-mTERTΔ-EGFP 系统地研究 mTERTΔ 表达对内源性 mTERT 的影响以及 LV-mTERTΔ-EGFP 应用于基因治疗的价值。

[参考文献]

[1] Szostak JW,Blackburn EH. Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors[J]. Cell,1982,29(1):245-255  
 [2] Greider CW,Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts[J]. Cell,1985,43(2 Pt 1):405-413  
 [3] Greider CW,Blackburn EH. A telomeric sequence in the

RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis[J]. Nature,1989,337(6205):331-337  
 [4] Collins K. Structure and function of telomerase[J]. Curr Opin Cell Biol,1996,8(3):374-80  
 [5] Calado RT,Young NS. Telomere diseases[J]. N Engl J Med,2009,361(24):2353-2365  
 [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] Hackett JA,Greider CW. Balancing instability:dual roles for telomerase and telomere dysfunction in tumorigenesis [J]. Oncogene,2002,21(4):619-626  
 [8] Jaskelioff M,Muller FL,Paik JH,et al. Telomerase reactivation reverses tissue degeneration in aged telomerase-deficient mice[J]. Nature,2011,469(7328):102-106  
 [9] Zhou QG,Hu Y,Wu DL,et al. Hippocampal telomerase is involved in the modulation of depressive behaviors[J]. J Neurosci,2011,31(34):12258-12269  
 [10] Cong Y,Shay JW. Actions of human telomerase beyond telomeres[J]. Cell Res,2008,18(7):725-732  
 [11] Nakayama J,Tahara H,Tahara E,et al. Telomerase activation by hTERT in human normal fibroblasts and hepato-

cellular carcinomas[J]. Nat Genet,1998,18(1):65-68

[12] Yuan X, Ishibashi S, Hatakeyama S, et al. Presence of telomeric G-strand tails in the telomerase catalytic subunit TERT knockout mice[J]. Genes Cells,1999,4(10):563-572

[13] Liu M, Hu Y, Zhu L, et al. Overexpression of the mTERT gene by adenoviral vectors promotes the proliferation of neuronal stem cells *in vitro* and stimulates neurogenesis in the hippocampus of mice [J]. J Biomed Res,2012,26(5):381-388

[14] 毕磊,陈方敏,石家齐,等. 人端粒酶逆转录酶在良性前列腺增生、前列腺上皮内瘤及前列腺癌中的表达及其意义[J]. 南京医科大学学报:自然科学版,2012,32(5):673-676

[15] 唐鹿群,张蕾,郭人花,等. 人端粒酶逆转录酶与热休克蛋白70融合表达载体的构建及原核表达 [J]. 南京医科大学学报:自然科学版,2007,27(8):825-828

[收稿日期] 2014-01-06

### 参考文献的著录格式

#### 1.期刊

[顺序号] 作者. 题名[J]. 刊名,年份,卷号(期号):起止页码

示例:

[1] 徐春阳,杨荣,张浩,等. NOMO1 基因在大鼠胚胎心脏发育过程中的表达[J].南京医科大学学报:自然科学版,2013,32(6):728-731

[2] Li JZ, Bunney BG, Meng F, et al. Circadian patterns of gene expression in the human brain and disruption in major depressive disorder [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013,110(24):9950-9955

#### 2.专著

[顺序号] 作者. 书名[M]. 版本. 出版地:出版者,年份:起止页码

示例:

[3] 何维. 医学免疫学[M]. 2版. 北京:人民卫生出版社,2010:136

#### 3.析出文献

[顺序号] 析出文献责任者. 析出文献题名[M]//. 析出文献其他责任者或专著主要责任者. 专著题名:其他题名信息. 出版地:出版者,年份:析出文献起止页码

示例:

[4] 林穗芳. 美国出版业概况[M]//陆本瑞. 世界出版概况. 北京:中国书籍出版社,1991:1-23

[5] 钟文发. 非线性规划在可燃毒物配置中的应用 [C]//赵玮. 运筹学的理论与应用:中国运筹学会第五届大会论文集. 西安:西安电子科技大学出版社,1996:468-471

(本刊编辑:接雅俐)