



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.12.012
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2016.12.012
Chinese Journal of General Surgery, 2016, 25(12):1738-1744.

· 基础研究 ·

靶向 hTERT、hTR 新型 RNAi 表达框架的构建及应用效果观察

李亚红, 赵丹丹, 黄丹, 刘蕾, 朱文琦, 彭剑雄

(中南大学湘雅医学院 医学检验系, 湖南长沙 410013)

摘要

目的: 构建靶向 hTERT、hTR 的新型 RNAi 表达框架, 探讨单独及联合干扰 hTERT、hTR 基因对肿瘤细胞端粒酶活性、细胞凋亡及周期的影响, 以期找到肿瘤基因治疗的新策略。

方法: 融合 PCR 构建靶向 hTERT、hTR 的 RNAi 表达框架。各表达框架经鉴定后分别或联合转染 A549 细胞, TRAP-银染法及 TRAP-qPCR 法检测端粒酶活性, 流式细胞仪检测细胞凋亡及周期。

结果: 靶向 hTERT、hTR 的新型 RNAi 表达框架构建成功。与空白对照组或阴性对照组比较, 无论转染靶向 hTERT 或靶向 hTR 的 RNAi 表达框架后, A549 细胞的端粒酶活性均明显降低, 细胞凋亡率均明显增加, 细胞 G₁ 阻滞明显增加, 而联合转染靶向 hTERT 与靶向 hTR 的 RNAi 表达框架后, A549 细胞的上述改变较各自单独转染更为明显 (均 $P < 0.05$)。

结论: 靶向 hTERT、hTR 的新型 RNAi 表达框架能够有效抑制 A549 细胞的端粒酶活性, 诱导细胞凋亡, 改变细胞周期。以人工 miRNA 表达框架为基础的新型 RNAi 技术有望成为肿瘤基因治疗的新工具。

关键词

末端转移酶端粒; RNA 干扰; 表达框架

中图分类号: R730.5

Construction of novel RNAi expression cassettes targeting hTERT and hTR and their application effects

LI Yahong, ZHAO Dandan, HUANG Dan, LIU Lei, ZHU Wenqi, PENG Jianxiong

(Department of Medical Laboratory Sciences, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410013, China)

Abstract

Objective: To construct novel RNAi expression cassettes targeting hTERT and hTR, and then observe the effects of hTERT and hTR gene interference alone or in combination on telomerase activity, cell apoptosis and cell cycle in tumor cells, so as to find new strategies for tumor gene therapy.

Methods: The RNAi expression cassettes targeting hTERT or hTR gene were synthesized by overlap extension PCR. After identification, the established cassettes were transfected into A549 cells alone or in combination, and then the telomerase activity was detected by TRAP-silver staining and TRAP-qPCR, and cell apoptosis rate and cell cycle were determined by flow cytometry.

Results: The novel RNAi expression cassettes targeting hTERT and hTR were successfully constructed.

基金项目: 中南大学研究生科研创新基金资助项目 (2016zzts500); 中南大学本科生自由探索基金资助项目 (201610533579)。

收稿日期: 2016-10-31; **修订日期:** 2016-11-20。

作者简介: 李亚红, 中南大学湘雅医学院硕士研究生, 主要从事生物化学与分子生物学诊断方面的研究。

通信作者: 彭剑雄, Email: jxpeng@csu.edu.cn

Comparing with blank control group or negative control group, the telomerase activities were significantly reduced, the cell apoptosis rates were significantly increased and the G1 cell cycle arrest was significantly increased in A549 cells after transfection of the cassettes targeting either hTERT or hTR gene, and further, the above changes were more significant in A549 cells after combined transfection of the cassettes targeting hTERT and hTR gene than in those transfected with either of them alone (all $P < 0.05$).

Conclusion: The expression cassettes of novel RNAi targeting hTERT and hTR can effectively inhibit the telomerase activity, induce the cell apoptosis and change the cell cycle in A549 cells. Novel RNAi technology based on the artificial miRNA expression cassettes is expected to become a new tool in tumor gene therapy.

Key words Telomerase; RNA Interference; Expression Cassettes

CLC number: R730.5

端粒酶是维持真核生物染色体端粒长度的功能酶, 由人端粒酶逆转录酶 (hTERT), 人端粒酶 RNA 组分 (hTR) 及端粒酶相关蛋白构成^[1]。端粒酶的激活与恶性肿瘤的发生密切相关, 90% 左右的人原发性肿瘤中均可检测到端粒酶活性^[2]。

人工 miRNA 以内源性 miRNA 前体 (pre-miRNA) 为骨架, 将 pre-miRNA 的部分序列替换为目的序列后转入所研究细胞中, 利用内源性 miRNA 途径实现基因沉默, 具有干扰效率高, 毒性低等特点, 已成为研究 RNA 干扰 (RNAi) 的重要工具^[3-4]。本实验室成功构建了多种靶向干扰 hTERT 基因的 RNAi 表达框架^[5-7], 但利用人工 miRNA 表达框架对端粒酶 hTERT、hTR 基因同时进行干扰的研究国内外尚未见报道。本实验利用融合 PCR 构建新型 RNAi 表达框架, 将靶向 hTERT、hTR 的人工 miRNA 表达框架单独及共转染 A549 细胞 48h 后, 探索单独及联合干扰 hTERT、hTR 基因对 A549 细胞端粒酶活性和细胞增殖的影响, 验证所构建 RNAi 表达框架的有效性, 以期对肿瘤基因治疗探索新方法和高效作用靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

A549 细胞 (人非小细胞肺癌细胞株) 由本实验中心保存, pRNAT-U6.1/Neo (美国 Oligoengine 公司), Ex Taq DNA 聚合酶 (大连宝生物公司), 质粒小提试剂盒、Taq Master Mix, MgCl₂, dNTP, Taq DNA 聚合酶 (北京天根公司), SYBR Green Master Mix (日本 ToYoBo 公司), 胎牛血清 (杭州四季青公司), 1640 细胞培养液 (美国 Gibco 公司), Annexin V/PI 双染试剂盒, Cell Cycle Staining Kit (杭州联科生物公司), PCR 产物纯

化试剂盒、lipofectamine-2000^B 转染试剂 (美国 Thermo 公司)。所有引物及核苷酸序列均由上海生工生物公司合成。

1.2 方法

1.2.1 RNAi 表达框架的构建及鉴定 利用 RNAi 在线设计软件 “BLOCK-iTTM RNAi Designer” (Life Technologies 公司) 针对 hTERT、hTR 基因分别设计 2 条特异性干扰序列 (针对 hTERT 基因 2760-2780 位点和 3877-3897 位点; 针对 hTR 基因 44-64 位点和 143-163 位点) 及 1 条随机对照片段, 经 BLAST 排除非特异性同源序列。参考人源性 miRNA-30 的结构设计两端带侧翼序列的特异性干扰 miRNA, 其序列为: 5'-CAG AAG GCT AAA GAA GGT ATA TTG CTG TTG ACA GTG AGC Gpre-miRNATGC CTA CTG CCT CGG ACT TCA AGG GGC TAC TTT AGG TTTT-3' (下划线标注部分为人源性 miRNA-30 的 5' 端和 3' 端侧翼序列, pre-miRNA 为特异性 miRNA 前体结构, TTTT 为 U6 启动子终止序列)。将此干扰序列反义链的 5' 端添加 19 个碱基, 且该碱基与 U6 启动子 3' 端反向互补, 添加碱基后的片段命名为片段 N, 由上海生工生物公司合成。pre-miRNA 的序列分别为: GGA AGA CAG TGG TGA ACT TCC TAG TGA AGC CAC AGA TGT AGG AAG TTC ACC ACT GTC TTC C (hTERT 2760-2780); TGG GAA TTT GGA GTG ACC AAA TAG TGA AGC CAC AGA TGT ATT TGG TCA CTC CAA ATT CCC A (hTERT 3877-3897); GTC TAA CCC TAA CTG AGA AGG TAG TGA AGC CAC AGA TGT ACC TTC TCA GTT AGG GTT AGA C (hTR 44-64); GCC TTC CAC CGT TCA TTC TAG TAG TGA AGC CAC AGA TGT ACT AGA ATG AAC GGT GGA AGG C (hTR 143-163); TTG ATC

CGT ATT AAG CGT GAG TAG TGA AGC CAC AGA TGT ACT CAC GCT TAA TAC GGA TCA A (随机对照片段)。质粒小提试剂盒提取含 U6 启动子的质粒 pRNAT-U6.1/Neo, Primer Premier 5.0 软件设计引物 P1、P2、P3, 融合 PCR 构建人工 miRNA 表达框架 (图 1)。引物 P1、P2、P3 的序列分别为: 5'-GAA GCA TGA ATT CCC CAG TG-3'; 5'-CGC GTC CTT TCC ACA AGA TA-3'; 5'-AAA AAC CTA AAG TAG CCC CTT G-3'。PCR1 的反应体系包括质粒 DNA 模板 50 ng, 10 μmol/L 上、下游引物 P1、P2 各 1.4 μL, 2×Taq Master Mix 25 μL, 灭菌 DDW 补足体积至 50 μL。循环参数: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 1 min, 共 33 个循环; 72 °C 5 min。PCR2 的反应体系包括 dNTP Mix 4 μL, 10×Ex Taq buffer 5 μL, U6 启动子和片段 N 分别加 100 ng (PCR2 以 U6 启动子和片段 N 互为模板和引物, 虚线部分表示融合 PCR 的延伸方向), ExTaq 酶 0.25 μL, 灭菌 DDW 补足体积至 47.2 μL。循环参数: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 1 min, 共 6 个循环。PCR3 的反应体系为在 PCR2 产物的基础上加 10 μmol/L 的上、下游引物 P1、P3 各 1.4 μL。循环参数: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 64 °C 30 s, 72 °C 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 5 min。上述产物均经 25 g/L 的琼脂糖凝胶电泳, 并送上海生工生物公司进行 DNA 测序, 同时 RNA fold Web Server 网站预测特异性 miRNA 干扰序列的 RNA 二级结构。

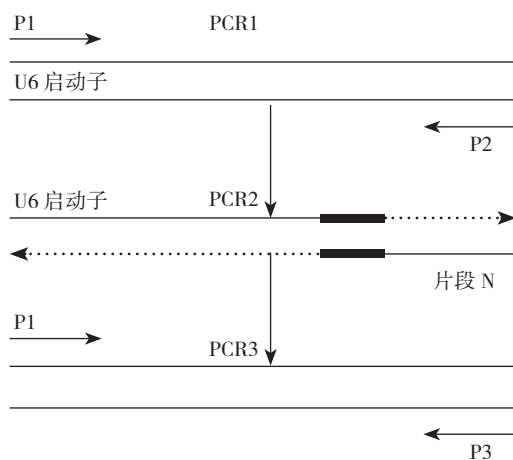


图 1 融合 PCR 构建人工 miRNA 表达框架示意图
 为反向互补区域; P1、P2、P3 为 PCR 引物

Figure 1 Schematic drawing of the construction of artificial miRNA expression cassettes by overlap extension PCR
 : reverse complementary region; P1, P2 and P3: PCR primers

1.2.2 细胞培养及转染 用含 10% 胎牛血清的 1640 细胞培养液在 5%CO₂, 37 °C 湿润环境中培养 A549 细胞。取对数生长期细胞接种于 6 孔板, 待细胞融合达 50%~60% 时用 lipofectamine-2000^R 转染试剂进行细胞转染。以只含转染试剂组为空白对照组, 随机序列组为阴性对照组, 实验组分别为单独干扰 hTERT、hTR 基因的 miR-1 (hTERT 2760-2780), miR-2 (hTERT 3877-3897), miR-3 (hTR 44-64), miR-4 (hTR 143-163) 组及两者联合干扰的 miR-2+4 (hTERT 3877-3897 和 hTR 143-163) 组。每组重复实验 3 次。

1.2.3 TRAP-银染法检测端粒酶活性 转染 48 h 后收集细胞, 按 Kim 法^[8]裂解细胞。端粒酶活性检测特异性引物为 TS 和 ACX, 其序列依次为: 5'-AAT CCG TCG AGC AGA GTT-3'; 5'-GCC CGG[CTTACC]₃CTA ACC-3'。30 μL 反应体系: dNTPs (0.5 mmol/L), 10×TRAP buffer, MgCl₂ (15 mmol/L) 各 3 μL, 细胞裂解液 (蛋白浓度 300 ng/μL) 4 μL, TS (10 μmol/L) 1.5 μL, 灭菌 DDW 13.6 μL, 25 °C 30 min; 94 °C 3 min; ACX (10 μmol/L) 1.5 μL, Taq DNA 聚合酶 (5 U/μL) 0.4 μL, 循环参数: 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min 共 35 个循环; 72 °C 5 min。PCR 产物经 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳后硝酸银染色。

1.2.4 TRAP-qPCR 检测端粒酶活性 TRAP-qPCR 法^[9]的引物同 TRAP-银染法, 以 TSR (5'-AAT CCG TCG AGC AGA GTT AG [GGTTAG]₇-3') 为标准品建立标准曲线, 对 TSR 进行连续 5 次的 10 倍稀释, 浓度分别为 (拷贝/μL): 6.02 × 10⁷、6.02 × 10⁶、6.02 × 10⁵、6.02 × 10⁴、6.02 × 10³。20 μL 反应体系: SYBR Green qPCR Mix 10 μL, ACX (10 μmol/L) 0.4 μL, TS (10 μmol/L) 0.4 μL, 细胞裂解液 (蛋白浓度 300 ng/μL) 或 TSR 2 μL, 50×ROX 0.4 μL, 灭菌双蒸水补足体积至 20 μL。25 °C 30 min, 95 °C 10 min; 95 °C 15 s, 60 °C 40 s, 共 40 个循环。标准品和实验组各重复实验 3 次。

1.2.5 流式检测细胞凋亡 细胞转染 48 h 后不含 EDTA 的胰蛋白酶消化, 离心收集 5 × 10⁵ 个细胞, 取 500 μL 1×Binding Buffer 重悬细胞, 加入 5 μL AnnexinV-FITC 和 10 μL PI, 轻柔混匀后室温避光孵育 5 min, 流式细胞仪检测。

1.2.6 流式检测细胞周期 细胞转染 48 h 后收集 5 × 10⁵ 个细胞, 离心弃上清, 取 0.5 mL PBS 重悬

细胞并加至 1.5 mL 的冰无水乙醇中, -20 °C 固定过夜, 离心弃乙醇, 加入 2 mL PBS 放置 15 min, 离心弃上清, 加入 1 mL DNA staining solution, 混匀, 室温避光孵育 30 min, 流式细胞仪检测。

1.3 统计学处理

应用统计软件 SPSS 18.0 进行统计学分析, 数据以均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较用单因素方差分析, 两两间比较用 LSD 检验 (方差齐) 或 Dunnett 检验 (方差不齐), $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 RNAi 表达框架的鉴定

琼脂糖凝胶电泳结果显示融合 PCR 产物片段长度为 482 bp, 与预期结果一致 (图 2); 测序结果显示产物的 DNA 序列与设计的 RNAi 表达框架一致; RNA fold Web Server 预测 RNA 二级结构, 预测结果显示特异性 miRNA 干扰序列的二级结构与人源性 miRNA-30 的二级结构高度相似。

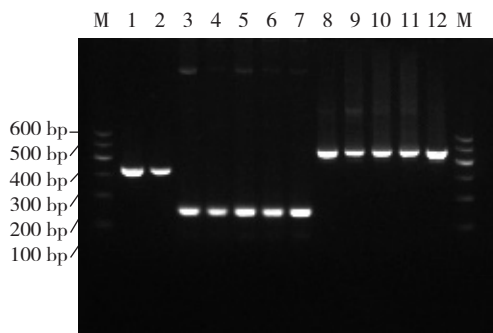


图 2 琼脂糖凝胶电泳图 M: DNA 标志 I; 1-2: U6 启动子 (340 bp); 3-7: 分别针对 hTERT 2760-2780、3877-3897 位点, hTR 44-64、143-163 位点和阴性对照的片段 N (161 bp); 8-12: 分别针对 hTERT 2760-2780、3877-3897 位点, hTR 44-64、143-163 位点和阴性对照的人工 miRNA 表达框架 (482 bp)

Figure 2 Agarose gel electrophoresis M: DNA marker I; 1-2: U6 promoter (340 bp); 3-7: Sequences N targeting the site of hTERT 2760-2780 and 3877-3897, hTR 44-64 and 143-163, and negative control (161 bp), respectively; 8-12: Artificial miRNA expression cassettes targeting the site of hTERT 2760-2780 and 3877-3897, hTR 44-64 and 143-163, and negative control (482 bp)

2.2 TRAP-银染法定性检测端粒酶活性

结果显示, 与空白对照组比较, 各实验组 (miR-1 组、miR-2 组、miR-3 组、miR-4 组) A549

细胞端粒酶活性均受到不同程度的抑制, 尤其 hTERT、hTR 联合干扰组 (miR-2+4 组) 细胞端粒酶活性抑制最明显; 阴性对照组未见明显抑制 (图 3)。

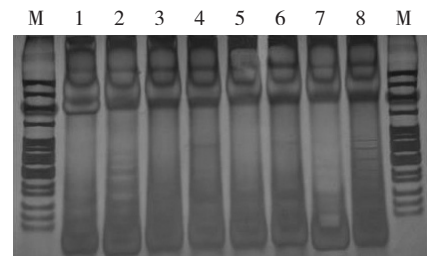


图 3 TRAP-银染法检测端粒酶活性 M: pBR322 DNA/MspI 标志; 1: 双蒸水替代细胞裂解液组; 2: 空白对照组; 3-7: 分别为 miR-1、miR-2、miR-3、miR-4 和 miR-2+4 组; 8: 阴性对照组

Figure 3 Telomerase activity determination by TRAP-silver staining M: pBR322 DNA/MspI marker; 1: DDW group; 2: Blank control group; 3-7: miR-1, miR-2, miR-3, miR-4 and miR-2+4 group, respectively; 8: Negative control group

2.3 TRAP-qPCR 法定量检测端粒酶活性

TRAP-荧光定量 PCR 法检测端粒酶活性, 以端粒酶延伸产物的量来反映端粒酶活性, 单因素方差分析显示, 组间差异有统计学意义 ($F = 88.78, P < 0.05$)。阴性对照组与空白对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。各实验组与阴性对照组比较, 端粒酶活性均受到不同程度的抑制, 且差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。联合干扰组与各单独干扰组比较, 端粒酶活性进一步降低 (均 $P < 0.05$) (表 1)。

表 1 TRAP-qPCR 法检测端粒酶活性

组别	平均数 (拷贝/μL)	标准差
空白对照组	300 592.23	28 183.76
阴性对照组	310 190.10	33 216.31
miR-1 组	110 376.24	32 675.11
miR-2 组	68 803.28	5 527.44
miR-3 组	150 469.80	10 915.96
miR-4 组	75 871.33	5 402.65
miR-2+4 组	30 208.11	4 739.74

2.4 流式检测细胞凋亡率

流式检测结果显示, A549 细胞各组的细胞凋亡率分别是: 空白对照组 (4.62 ± 0.70)%, 阴性对照组 (6.38 ± 1.26)%, miR-1 组 (24.23 ± 1.07)%,

miR-2 组 (24.62 ± 2.12)%，miR-3 组 (17.85 ± 1.23)%，miR-4 组 (21.13 ± 2.11)%，miR-2+4 组 (28.36 ± 2.09)%。阴性对照组与空白对照组比较，差异无统计学意义 ($P > 0.05$)；

各干扰组细胞凋亡率较阴性对照组明显增高 (均 $P < 0.05$)，联合干扰组 (miR-2+4) 细胞凋亡率较各单独干扰组明显增高 (均 $P < 0.05$) (图 4)。

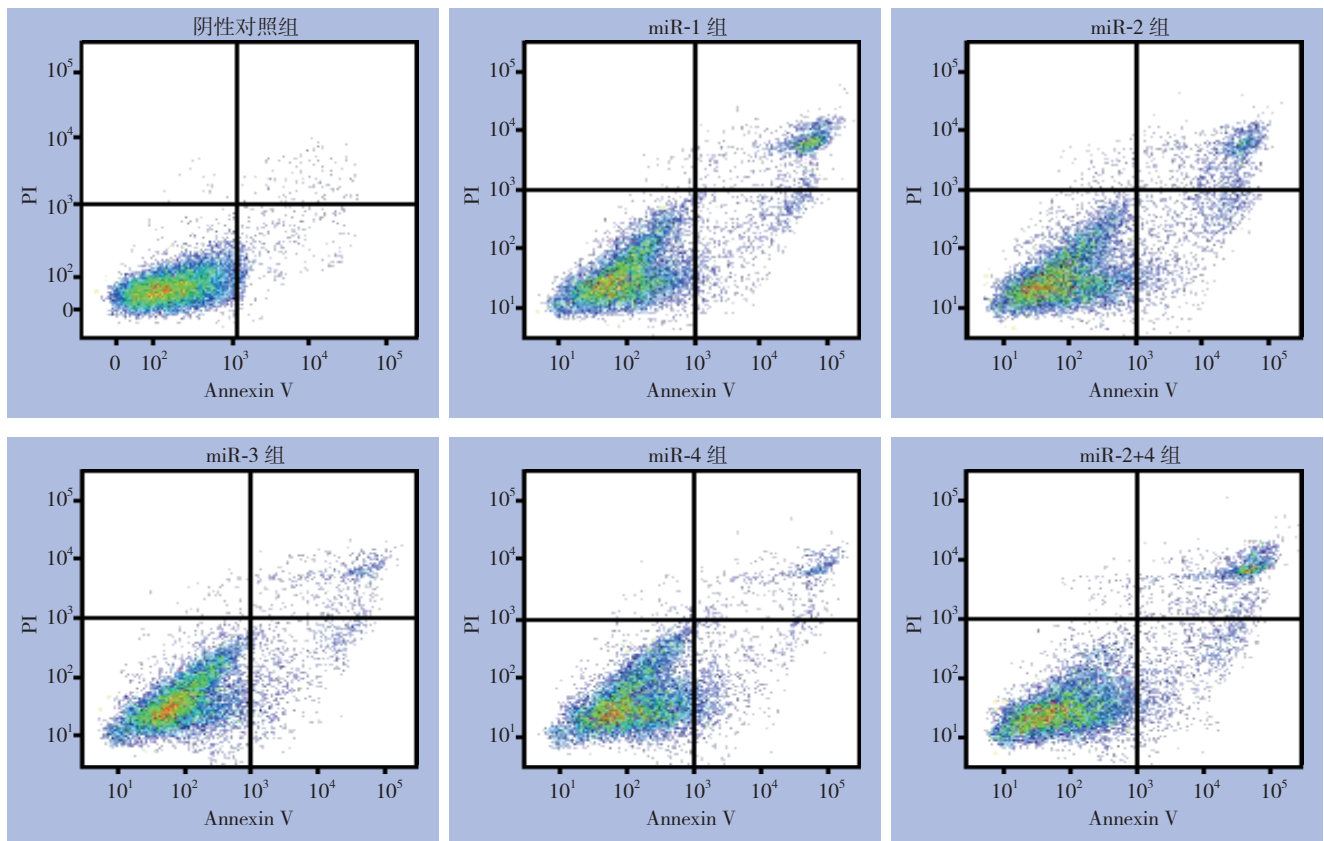


图 4 AnnexinV/PI 双染法检测细胞凋亡率

Figure 4 Cell apoptosis detected by AnnexinV/PI double-staining

2.5 流式检测细胞周期

流式检测结果显示 A549 细胞 G₁ 期、S 期百分比在各组中分别为：空白对照组 (33.67 ± 1.36)%、(37.27 ± 1.12)%；阴性对照组 (34.14 ± 1.30)%、(36.62 ± 1.14)%；miR-1 (46.43 ± 1.31)%、(31.17 ± 0.93)%；miR-2 (48.67 ± 1.36)%、(29.15 ± 0.94)%；miR-3 (42.31 ± 1.19)%、(33.41 ± 1.20)%；miR-4 (47.61 ± 1.37)%、(28.82 ± 1.11)%；miR-2+4 (59.58 ± 1.42)%、(25.25 ± 0.97)%。阴性对照组与空白对照组比较，G₁ 期和 S 期的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)；各干扰组细胞较阴性对照组 G₁ 期比例明显升高，S 期比例明显降低 (均 $P < 0.05$)，联合干扰组较各单独干扰组对 A549 细胞 G₁ 期和 S 期的影响更明显 (均 $P < 0.05$)。

3 讨论

端粒、端粒酶的发现及相关研究的深入，将人类对衰老、肿瘤的认识带入了一个崭新的时代^[10]。肿瘤细胞通过激活端粒酶使细胞获得无限增殖的能力，作为最为广谱的肿瘤分子标记，端粒酶已经成为肿瘤基因治疗的重要靶标之一。hTERT 和 hTR 作为端粒酶的重要组件，是维持端粒酶活性的主要限速因子^[11-12]。由于 hTERT 与 hTR 的重要作用，两者成为了沉默端粒酶功能的重要靶点^[13-15]，基于 hTERT 与 hTR 的 RNAi 技术有望成为肿瘤基因治疗的理想工具。

然而如何实现安全有效的 RNAi 仍是一个亟待解决的问题，siRNA 的过度表达会与内源性

miRNA的生成发生竞争而扰乱miRNA的生物学功能,甚至导致研究对象产生剧烈的毒性反应^[16-17]。miRNA作为内源性转录产物,生物安全性较外源性siRNA有所提高^[18],基于miRNA的RNAi技术也越来越受关注。本实验室已成功构建了基于鼠源性miRNA-155的人工miRNA表达框架,且成功应用于hTERT基因的干扰^[19]。受此启发本实验设计了基于人源性miRNA-30的人工miRNA表达框架,尽量减少引入外源基因。Gu等^[20]发现III类启动子较II类启动子转录效率更高,尤以U6启动子更突出,故本实验选择U6启动子作为启动序列,参考人源性miRNA-30的侧翼序列和前体结构,由此设计了带独立启动子的人工miRNA表达框架。相对于构建质粒载体更简便省时,融合PCR 24 h内即可成功合成该表达框架,转染细胞48 h后即可进行干扰效果的评估,周期短、操作简单,更利于干扰位点的筛选,同时避免了外源质粒基因的带入。

本实验利用人工miRNA表达框架同时对hTERT和hTR基因进行干扰,结果表明单独干扰hTERT 2760-2780、3877-3897位点和hTR 44-64、143-163位点均能抑制A549细胞的端粒酶活性,诱导细胞凋亡,并将细胞周期阻滞在G₁期,但以hTERT 3877-3897位点和hTR 143-163位点的干扰效果更明显,且对两者联合干扰较单独干扰对端粒酶和细胞增殖的影响更显著。说明miRNA主要作用于3'端非翻译区(3'UTR),且hTERT和hTR基因的联合干扰是一种更有效的作用方式,这与其他研究^[21-22]得出的结论一致。本实验成功创建了一种新的实现基因沉默和筛选作用靶点的有效工具,同时发现hTERT和hTR基因的联合干扰是抑制A549细胞端粒酶活性和影响细胞增殖的有效方法,为肿瘤基因治疗提供了新的参考。然而所构建的人工miRNA表达框架能否作用于更多的细胞及是否更安全还不得而知,这需要更多的实验来探索和验证。

参考文献

- [1] MacNeil DE, Bensoussan HJ, Autexier C. Telomerase Regulation from Beginning to the End[J]. *Genes(Basel)*, 2016, 7(9). pii: E64. doi: 10.3390/genes7090064.
- [2] Xu Y, Goldkorn A. Telomere and Telomerase Therapeutics in Cancer[J]. *Genes(Basel)*, 2016, 7(6). pii: E22. doi: 10.3390/genes7060022.
- [3] Winter J, Link S, Witzigmann D, et al. Loop-miRs: active microRNAs generated from single-stranded loop regions[J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(10):5503-5512.
- [4] Tiwari M, Sharma D, Trivedi PK. Artificial microRNA mediated gene silencing in plants: progress and perspectives[J]. *Plant Mol Biol*, 2014, 86(1/2):1-18.
- [5] 张琴,巢时斌,付文金,等.体外构建的小片段发夹RNA对肿瘤细胞端粒酶基因表达的干扰[J].*中国普通外科杂志*, 2008, 17(2):148-152.
Zhang Q, Cao SB, Fu WJ, et al. Silencing telomerase gene expression in HeLa by small hairpin RNA in vitro[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2008, 17(2):148-152.
- [6] 张慧慧,陈明,罗建新,等.体外构建双H1启动子SECs及其对HepG2细胞端粒酶活性的干扰作用[J].*中国普通外科杂志*, 2009, 18(1):53-57.
Zhang HH, Chen M, Luo JX, et al. The interfering effect of construction of double-H1 promoters SECs on telomerase gene expression in HepG2 cells[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2009, 18(1):53-57.
- [7] 龚霞,张慧慧,彭剑雄,等.U6/H1双启动子siRNA表达框架构建及其对肿瘤细胞端粒酶活性的干扰作用[J].*中国普通外科杂志*, 2014, 23(6):769-774.
Gong X, Zhang HH, Peng JX, et al. Construction of U6/H1 dual promoter siRNA expression cassettes and their interfering effects on telomerase activity in tumor cells[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2014, 23(6):769-774.
- [8] Kim NW, Wu F. Advances in quantification and characterization of telomerase activity by the telomeric repeat amplification protocol (TRAP)[J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(13):2595-2597.
- [9] Hou M, Xu D, Björkholm M, et al. Real-Time Quantitative Telomeric Repeat Amplification Protocol Assay for the Detection of Telomerase Activity[J]. *Clin Chem*, 2001, 47(3):519-524.
- [10] Bernardes de Jesus B, Blasco MA. Telomerase at the intersection of cancer and aging[J]. *Trends Genet*, 2013, 29(9):513-520.
- [11] Ramlee MK, Wang J, Toh WX, et al. Transcription Regulation of the Human Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT) Gene[J]. *Genes(Basel)*, 2016, 7(8). pii: E50. doi: 10.3390/genes7080050.
- [12] Feng J, Funk WD, Wang SS, et al. The RNA component of human telomerase[J]. *Science* 1995, 269(5228):1236-1241.
- [13] Li Y, Li H, Yao G, et al. Inhibition of telomerase RNA (hTR) in cervical cancer by adenovirus-delivered siRNA[J]. *Cancer Gene Ther*, 2007, 14(8):748-755.
- [14] Park YJ, Kim EK, Moon S, et al. Human telomerase reverse transcriptase is a promising target for cancer inhibition in squamous cell carcinomas[J]. *Anticancer Res*, 2014, 34(11):6389-6395.
- [15] Lavanya C, Sibin MK, Srinivas Bharath MM, et al. RNA interference mediated downregulation of human telomerase reverse

- transcriptase (hTERT) in LN18 cells[J]. Cytotechnology, 2016, 68(6):2311-2321.
- [16] Grimm D, Streetz KL, Jopling CL, et al. Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways[J]. Nature, 2006, 441(7092):537-541.
- [17] Grimm D, Wang L, Lee JS, et al. Argonaute proteins are key determinants of RNAi efficacy, toxicity, and persistence in the adult mouse liver[J]. J Clin Invest, 2010, 120(9):3106-3119.
- [18] Liu XY, Tang QS, Chen HC, et al. Lentiviral miR30-based RNA interference against heparanase suppresses melanoma metastasis with lower liver and lung toxicity[J]. Int J Biol Sci, 2013, 9(6):564-577.
- [19] 徐慧, 龚霞, 赵丹丹, 等. 靶向hTERT人工miRNA表达框架的构建及其对HepG2细胞端粒酶活性的抑制作用[J]. 中国普通外科杂志, 2014, 23(12):1647-1651.
- Xu H, Gong X, Zhao DD, et al. Construction of artificial miRNA expression cassettes targeting hTERT and their inhibitory effects on telomerase activity in HepG2 cells[J]. Chinese Journal of General Surgery, 2014, 23(12):1647-1651.
- [20] Gu S, Jin L, Zhang Y, et al. The loop position of shRNAs and pre-miRNAs is critical for the accuracy of dicer processing in vivo[J]. Cell, 2012, 151(4):900-911.
- [21] Farazi TA, Hoell JI, Morozov P, et al. MicroRNAs in human cancer[J]. Adv Exp Med Biol, 2013, 774:1-20. doi: 10.1007/978-94-007-5590-1_1.
- [22] Cheng W, Wei Z, Gao J, et al. Effects of combined siRNA-TR and -TERT on telomerase activity and growth of bladder transitional cell cancer BIU-87 cells[J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2010, 30(3):391-396.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 李亚红, 赵丹丹, 黄丹, 等. 靶向hTERT、hTR新型RNAi表达框架的构建及应用效果观察[J]. 中国普通外科杂志, 2016, 25(12):1738-1744. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.12.012

Cite this article as: Li YH, Zhao DD, Huang D, et al. Construction of novel RNAi expression cassettes targeting hTERT and hTR and their application effects[J]. Chin J Gen Surg, 2016, 25(12):1738-1744. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.12.012

关于一稿两投和一稿两用问题处理的声明

本刊编辑部发现仍有个别作者一稿两投和一稿两用, 为了维护本刊的声誉和广大读者的利益, 本刊就一稿两投和一稿两用问题的处理声明如下。

1. 一稿两投和一稿两用的认定: 凡属原始研究的报告, 同语种一式两份投寄不同的杂志, 或主要数据和图表相同、只是文字表达可能存在某些不同之处的两篇文稿, 分别投寄不同的杂志, 属一稿两投; 一经为两杂志刊用, 则为一稿两用。会议纪要、疾病的诊断标准和防治指南、有关组织达成的共识性文件、新闻报道类文稿分别投寄不同的杂志, 以及在一种杂志发表过摘要而将全文投向另一杂志, 不属一稿两投。但作者若要重复投稿, 应向有关杂志编辑部作出说明。

2. 作者在接收到收稿回执后满 3 个月未接到退稿通知, 表明稿件仍在处理中, 若欲投他刊, 应先与本刊编辑部联系。

3. 编辑部认为文稿有一稿两投或两用嫌疑时, 应认真收集有关资料并仔细核对后再通知作者, 在作出处理决定前请作者就此问题作出解释。编辑部与作者双方意见发生分歧时, 由上级主管部门或有关权威机构进行最后仲裁。

4. 一稿两投一经证实, 则立即退稿, 对该作者作为第一作者所撰写的论文, 2 年内将拒绝在本刊发表; 一稿两用一经证实, 将择期在杂志中刊出作者姓名、单位以及该论文系重复发表的通告, 对该作者作为第一作者所撰写的论文, 2 年内拒绝在本刊杂志发表。本刊将就此事向作者所在单位和该领域内的其他科技期刊进行通报。

中国普通外科杂志编辑部