

DOI: 10.16781/j.0258-879x.2018.10.1132

• 研究快报 •

慢病毒介导的 shRNA 干扰大鼠施万细胞 RSC96 MYH14 基因的表达

胡皓^{1,2}, 孟威¹, 刘安堂¹, 汪汇¹, 朱晓海¹, 江华¹, 钱玉鑫^{1,3*}

1. 海军军医大学(第二军医大学)长征医院整形外科, 上海 200003

2. 武警总队医院皮肤科, 北京 100600

3. 上海伊莱美医疗美容医院, 上海 200070

[摘要] **目的** 应用 RNA 干扰技术构建大鼠肌球蛋白重链 14 (MYH14) 基因重组慢病毒载体并鉴定。**方法** 根据 MYH14 mRNA 序列设计合成单链引物形成双链寡核苷酸序列, 接入经 Age I 和 BamH I 双酶切线性化的 GV298 慢病毒质粒载体中, 菌液经 PCR 鉴定并测序验证。取测序正确的菌液提取质粒转染大鼠施万细胞 RSC96, 利用免疫荧光法观察转染效率, 蛋白质印迹法筛选有效敲低 MYH14 的 shRNA 质粒, CCK-8 法检测转染后 RSC96 细胞的活力。**结果** 合成 3 对 MYH14-shRNA 序列并将其克隆到 GV298 载体中, 构建了重组质粒 MYH14-shRNA1、2、3, 经菌液 PCR 鉴定和测序筛选出测序正确的载体 MYH14-shRNA1 和 MYH14-shRNA2。免疫荧光检测结果显示转染 72 h 时 RSC96 细胞荧光表达最强; 蛋白质印迹法检测结果显示, 与阴性对照 (scramble 序列) 组相比, MYH14-shRNA2 转染后 RSC96 细胞中 MYH14 蛋白的表达水平降低 (0.57 ± 0.15 vs 1.11 ± 0.06 , $P < 0.01$), 而 MYH14-shRNA1 转染后 MYH14 蛋白表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。MYH14-shRNA2 转染 RSC96 细胞 24 h 后的细胞活力与阴性对照组相比差异无统计学意义 (1.09 ± 0.16 vs 1.00 ± 0.15 , $P > 0.05$)。**结论** 成功构建大鼠 MYH14 基因重组慢病毒干扰载体, 该载体能有效下调 RSC96 细胞中 MYH14 的表达。

[关键词] 肌球蛋白重链 14; 短发夹 RNA; 慢病毒; 施万细胞**[中图分类号]** R 349.65 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2018)10-1132-06

Interference effect of lentiviral mediated shRNA on expression of MYH14 gene in rat Schwann cells RSC96

HU Hao^{1,2}, MENG Wei¹, LIU An-tang¹, WANG Hui¹, ZHU Xiao-hai¹, JIANG Hua¹, QIAN Yu-xin^{1,3*}

1. Department of Plastic Surgery, Changzheng Hospital, Navy Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200003, China

2. Department of Dermatology, General Hospital of Armed Police Forces, Beijing 100600, China

3. Shanghai Elikeme Medical Cosmetology Hospital, Shanghai 200070, China

[Abstract] **Objective** To construct and identify rat myosin heavy chain 14 (MYH14) gene recombined lentiviral vector by RNA interference technique. **Methods** Based on the MYH14 mRNA sequence, a single-stranded primer was designed to form a double-stranded oligonucleotide sequence, which was ligated into the GV298 lentiviral vector linearized by Age I and BamH I double enzymes restriction, and then the bacterial liquid was verified by PCR and sequencing, respectively. The plasmid was extracted in the bacterial liquid with correct sequence and transfected into rat Schwann cells RSC96. The transfection efficiency was observed by immunofluorescence, the shRNA plasmid could effectively knock down MYH14 was screened by Western blotting, and the cell viability of RSC96 cells after transfection was detected by CCK-8. **Results** Three pairs of MYH14-shRNA sequences were synthesized and cloned into GV298 vector to construct recombinant plasmids MYH14-shRNA1, 2, and 3, and the vector MYH14-shRNA1 and MYH14-shRNA2 were screened by PCR and sequencing. Immunofluorescence showed that the cell fluorescence was the strongest at 72 h after transfection. Western blotting analysis showed that compared with the negative control (scramble sequence) group, the expression level of MYH14 protein in RSC96 cells was significantly decreased after MYH14-shRNA2 transfection (0.57 ± 0.15 vs 1.11 ± 0.06 , $P < 0.01$), while there was no significant difference after MYH14-shRNA1 transfection ($P > 0.05$). There was no significant difference in cell viability of RSC96 cells between the negative control and MYH14-shRNA2 groups 24 h after transfection (1.09 ± 0.16 vs 1.00 ± 0.15 , $P > 0.05$). **Conclusion** The rat MYH14 gene recombinant lentiviral vector has been successfully constructed,

[收稿日期] 2018-06-12 **[接受日期]** 2018-09-10**[基金项目]** 国家自然科学基金(31271264). Supported by National Natural Science Foundation of China (31271264).**[作者简介]** 胡皓, 博士生. E-mail: cs0701@126.com

*通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81886777, E-mail: dosjh@126.com

which can effectively down-regulate the expression of MYH14 in RSC96 cells.

[Key words] myosin heavy chain 14; short hairpin RNA; lentivirus; Schwann cells

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2018, 39(10): 1132-1137]

水通道蛋白 (aquaporins, AQP) 是细胞膜转运水的特异性通道蛋白, 在维持机体水平衡中具有重要作用, 与一系列水平衡紊乱所造成的疾病密切相关^[1]。本课题组在前期研究中发现施万细胞主要表达 AQP1, 且细胞的水肿形成与 AQP1 的表达呈正相关^[2-3]。进一步研究 AQP1 的表达调控机制时发现低浓度乙酰唑胺 (acetazolamide, AZA) 能抑制施万细胞中 AQP1 的表达^[4], 提示其对 AQP1 有负性调节作用, 但相关机制尚无深入报道。

细胞骨架及其相关蛋白在对 AQP 的调节中, 特别是在穿梭机制调节中的作用研究越来越深入。有研究发现 AZA 在人胚肾细胞 HEK293 中通过与肌球蛋白重链 (myosin heavy chain, MHC) 相互作用抑制 AQP 的表达, 证实细胞骨架蛋白参与 AQP 在短期调节机制中的调节作用^[5-6]。本课题组利用免疫沉淀及蛋白质谱分析技术在施万细胞中筛选出目的分子肌球蛋白重链 14 (myosin heavy chain 14, MYH14)。*MYH14* 基因是细胞骨架蛋白家族成员, 基于肌动蛋白的动力发挥作用, 提示其可能参与了 AQP1 在穿梭机制中的调节作用。本研究通过构建 *MYH14* 特异性短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 慢病毒载体下调 MYH14 的表达, 为后续验证 MYH14 对施万细胞中 AQP1 的表达调控作用奠定实验基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料 大鼠施万细胞 RSC96 细胞株购自中国科学院细胞库。鼠抗 MYH14 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司, 鼠抗 GAPDH 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司, CCK-8 细胞活力检测试剂购自东仁化学科技 (上海) 有限公司, 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、DMEM 培养液购自美国 Gibco 公司, 青、链霉素双抗购自美国 HyClone 公司, Lipofectamine 3000 购自美国 Invitrogen 公司, GeneRuler DNA Ladder、T₄ DNA 连接酶购自美国 Thermo 公司, NormalRun™ 250 bp- II DNA Ladder、引物购自上海捷瑞生物工程有限公司, 真核表达 GV298 载体 (*Age* I/*Bam*H I 酶切)、TOP10 感受

态细胞购自上海吉凯基因化学技术有限公司, 限制性核酸内切酶购自美国 NEB 公司, 高产量 *Taq* 聚合酶 (*Taq* Plus DNA polymerase) 购自南京诺唯赞生物科技有限公司, 质粒提取试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司。

1.2 shRNA 序列设计 从美国国立生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 获取 3 个大鼠 *MYH14* mRNA (NM-001100690) 的靶点序列, 分别为 *MYH14*-shRNA1、*MYH14*-shRNA2 和 *MYH14*-shRNA3。选取无关序列 (scramble 序列) 作为阴性对照序列 (negative control shRNA, NC-shRNA), 经 Blast 序列比对显示其与大鼠已知基因均无明显同源性, 具体序列见表 1。

1.3 shRNA 慢病毒载体的构建 使用 *Age* I/*Bam*H I 限制性内切酶对真核表达载体 GV298 进行双酶切使其线性化, 将由 shRNA 反转录合成的 DNA (表 2) 溶解于退火液中梯度退火。取线性化载体 100 ng、双链 DNA 100 ng、10×T₄ DNA 连接酶缓冲液 2 μL、T₄ DNA 连接酶 1 μL, 加入双蒸水至总体积 20 μL, 16 °C 静置过夜合成连接产物。取 10 μL 产物加入到 100 μL 感受态细胞中, 冰上放置 30 min; 42 °C 激活 90 s, 冰浴 2 min; 加入 500 μL LB 培养液, 37 °C 摇床振荡培养 1 h; 取适量菌液均匀涂布在含有相应抗生素的平板上, 恒温培养箱中倒置培养 12~16 h。

1.4 PCR 鉴定 设计引物序列 (表 3), 配制 PCR 反应体系 (双蒸水 9.2 μL, 2×*Taq* Plus MasterMix 10 μL, 上、下游引物各 0.4 μL), 振荡混匀, 短暂离心。在超净台中用无菌枪头挑取单个菌落至 20 μL 鉴定体系中, 吹打混匀, 置于 PCR 仪中测定。将鉴定出的阳性克隆转化子接种于适量 LB 培养液中, 37 °C 培养 12~16 h, 取适量菌液进行测序。对测序结果与目的基因序列进行比对分析, 并抽提阳性克隆质粒转染细胞。

1.5 质粒提取 取测序正确的菌液于 15 mL 含氨苄西林的 LB 培养液中 37 °C 培养过夜, 收集菌液于 15 mL 离心管中, 1 000×g 离心 2 min, 弃上清,

加入 250 μL 细胞重悬液,充分振荡使菌块悬浮均匀;加入 250 μL 细胞裂解液和 10 μL 蛋白酶 K,轻轻混匀,静置 1~2 min 使菌体裂解澄清;加入 350 μL 中和液,上下颠倒混匀,使蛋白完全析出,冰浴静置 5 min; 14 000×g 离心 10 min,弃蛋白,收集上清于另一无菌 1.5 mL 离心管中; 12 000×g 离心 5 min,将上清转移至回收柱中, 13 000×g 离

心 1 min,弃下层废液;加入 600 μL 预先配制的漂洗液, 13 000×g 离心 1 min,弃下层废液,重复 1 次, 13 000×g 空离 2 min,除去残留的漂洗液;将回收柱转移至新的 1.5 mL 离心管中,静置 10~20 min,自然晾干;加入 95 μL 无核酸酶水,静置 2 min, 13 000×g 离心 2 min,收集质粒测定浓度并进行质量检查。

表 1 MYH14-shRNA 的序列信息

Tab 1 MYH14-shRNA sequences

Target	Species	Sequence (5'-3')	GC content (%)
MYH14-shRNA1	Rat	GGG AGC AAA CAT CGA GAC CTA	52.38
MYH14-shRNA2	Rat	GAC CAC AGA GGC CAA GAT GAA	52.38
MYH14-shRNA3	Rat	GAG GAG AAG GCT GCA GTG CTA	57.14
NC-shRNA (scramble sequence)		TTC TCC GAA CGT GTC ACG T	

MYH14: Myosin heavy chain 14; shRNA: Short hairpin RNA; NC: Negative control

表 2 MYH14-shRNA 的 DNA 序列

Tab 2 DNA sequences of MYH14-shRNA

Gene	Sequence (5'-3')
MYH14-shRNA1	CCG GGG GAG CAA ACA TCG AGA CCT ACT CGA GTA GGT CTC GAT GTT TGC TCC CTT TTT G GAT CCA AAA AGG GAG CAA ACA TCG AGA CCT ACT CGA GTA GGT CTC GAT GTT TGC TCC C
MYH14-shRNA2	CCG GGA CCA CAG AGG CCA AGA TGA ACT CGA GTT CAT CTT GGC CTC TGT GGT CTT TTT G GAT CCA AAA AGA CCA CAG AGG CCA AGA TGA ACT CGA GTT CAT CTT GGC CTC TGT GGT C
MYH14-shRNA3	CCG GGA GGA GAA GGC TGC AGT GCT ACT CGA GTA GCA CTG CAG CCT TCT CCT CTT TTT G GAT CCA AAA AGA GGA GAA GGC TGC AGT GCT ACT CGA GTA GCA CTG CAG CCT TCT CCT C

MYH14: Myosin heavy chain 14; shRNA: Short hairpin RNA

表 3 引物序列

Tab 3 Primer sequences

Gene	Sequence (5'-3')
MYH14-shRNA1	F: GCC CCG GTT AAT TTG CAT AT R: ATG TCC TTC TGC TGA TAC TGG G
MYH14-shRNA2	F: GCC CCG GTT AAT TTG CAT AT R: ATG TCC TTC TGC TGA TAC TGG G
MYH14-shRNA3	F: GCC CCG GTT AAT TTG CAT AT R: ATG TCC TTC TGC TGA TAC TGG G

MYH14: Myosin heavy chain 14; shRNA: Short hairpin RNA; F: Forward; R: Reverse

1.6 细胞转染 取 RSC96 细胞以 1×10^5 /mL 的密度贴壁培养于 6 孔板中,待细胞融合达 50%~60% 时更换为无血清培养液。在无菌离心管中配制工作液, A 液: opti-MEM 125 μL、Lipofectamine 3000 7.5 μL; B 液: shRNA 质粒 2.5 μg、opti-MEM 125 μL、P300 反应物 5 μL; 将 A、B 液混匀后室温孵育 15 min,加入到 6 孔板中转染细胞,在细胞培养箱中培养,于荧光显微镜下观察各时间点(24、28 和 72 h)的细胞转染情况。

1.7 蛋白质印迹分析 转染后培养 72 h 收集细

胞, PBS 洗涤,加入裂解液于冰上裂解 30 min; 4 °C 下 12 000×g 离心 20 min 取上清液,BCA 法测定蛋白质质量浓度。调整蛋白质质量浓度为 5 μg/μL,加入 5×蛋白上样缓冲液,沸水变性 5 min;按照蛋白质印迹操作程序电泳、转膜、封闭,一抗孵育过夜, TBST 洗膜后加入二抗室温孵育 2 h, TBST 洗膜后加入化学发光试剂显影、定影,使用 ImageJ 软件对各蛋白条带进行定量分析。

1.8 细胞活力检测 设置空白组、对照组、阴性对照组、MYH14-shRNA 组,空白组为不含细胞的 DMEM 培养液,对照组为未转染的 RSC96 细胞,阴性对照组和 MYH14-shRNA 组分别为转染 NC-shRNA 和 MYH14-shRNA2 后的细胞。将细胞悬液以 1×10^4 /孔的密度接种于 96 孔板中,贴壁培养 24 h 后用 PBS 漂洗,各孔更换为新鲜配制的含 10 μL CCK-8 的无血清 DMEM 培养液,继续孵育 1.5 h。用酶标仪测定 450 nm 下各孔的光密度(D)值,计算细胞活力。细胞活力(%) = (处理组 - 空白组) / (阴性对照组 - 空白组) × 100%。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 18.0 软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间均数的比较采用两独立样本 *t* 检验, 多组间均数的比较采用单因素方差分析。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 shRNA 慢病毒载体的构建与 PCR 鉴定 设计

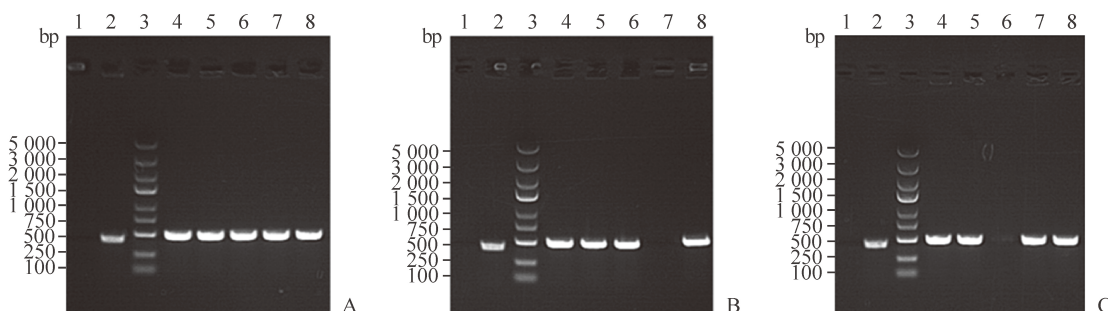


图 1 MYH14-shRNA 的 PCR 琼脂糖凝胶电泳图

Fig 1 PCR gel electrophoresis of MYH14-shRNA clone

A: MYH14-shRNA1; B: MYH14-shRNA2; C: MYH14-shRNA3. 1: Negative control (ddH₂O); 2: No load self-attached control; 3: Marker; 4-8: MYH14-shRNA (the positive cloned PCR fragment ligated into the shRNA fragment was 499 bp, and the empty vector cloned PCR fragment without attachment to shRNA fragment was 450 bp). MYH14: Myosin heavy chain 14; shRNA: Short hairpin RNA; PCR: Polymerase chain reaction

2.2 转染施万细胞株筛选有效干扰序列

2.2.1 荧光显微镜下观察各时间点的转染情况 分别使用 NC-shRNA、MYH14-shRNA1 和 MYH14-shRNA2 质粒转染 RSC96 细胞不同时间后, 荧光显微镜下观察转染细胞的荧光表达情况, 结果 (图 2) 可见各组质粒转染细胞后的荧光强度随时间增加逐渐增强, 至 72 h 时最强, 故采用转染 72 h 的细胞进行后续实验。

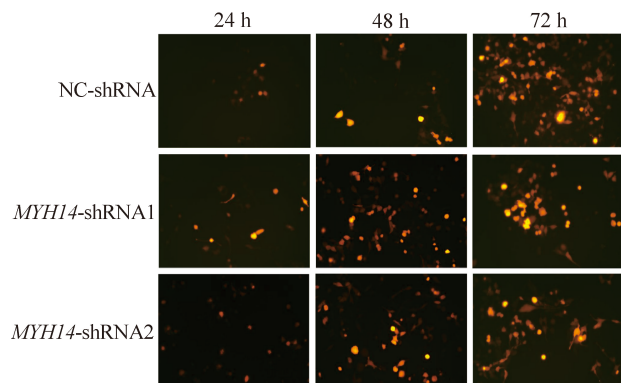


图 2 MYH14-shRNA 转染后不同时间点大鼠施万细胞 RSC96 的免疫荧光检测结果

Fig 2 Immunofluorescence of rat Schwann cells RSC96 at different time points after MYH14-shRNA transfection MYH14: Myosin heavy chain 14; shRNA: Short hairpin RNA; NC: Negative control. Original magnification: $\times 20$

引物时, 引物两端分别带有 Age I、BamH I 酶切位点, 双酶切后, 通过 T₄ DNA 连接酶等构建慢病毒, 经琼脂糖凝胶电泳观察可见条带与预计结果相符, 目的基因插入慢病毒表达载体内 (图 1)。重组质粒测序结果显示, MYH14-shRNA1 和 MYH14-shRNA2 的序列正确, MYH14-shRNA3 测序中断。

2.2.2 蛋白质印迹法检测 MYH14 蛋白的表达

变化 与阴性对照组相比, MYH14-shRNA1 组的 MYH14 蛋白表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 而 MYH14-shRNA2 组的 MYH14 蛋白表达水平降低 (0.57 ± 0.15 vs 1.11 ± 0.06 , $P < 0.01$), 见图 3。故使用 MYH14-shRNA2 质粒进行后续实验。

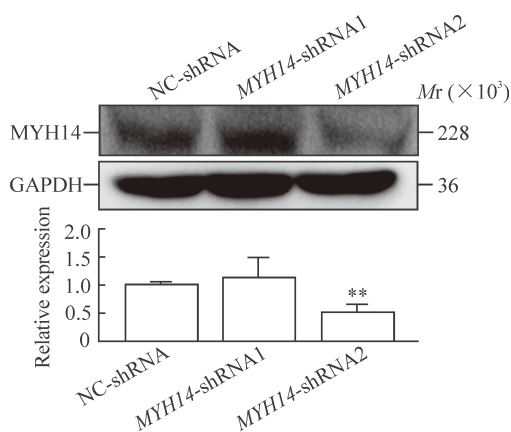


图 3 MYH14-shRNA2 转染下调大鼠施万细胞 RSC96 中 MYH14 的表达

Fig 3 MYH14-shRNA2 transfection down-regulates expression of MYH14 in rat Schwann cells RSC96

MYH14: Myosin heavy chain 14; shRNA: Short hairpin RNA; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; NC: Negative control. $**P < 0.01$ vs NC-shRNA group. $n=3, \bar{x} \pm s$

2.2.3 细胞活力测试 使用 *MYH14*-shRNA2 质粒转染 RSC96 细胞 24 h 后, *MYH14*-shRNA2 组的细胞活力与阴性对照组相比差异无统计学意义 (1.09 ± 0.16 vs 1.00 ± 0.15 , $P > 0.05$), 提示 *MYH14*-shRNA 转染后 *MYH14* 蛋白水平降低对细胞活力无影响 (图 4)。

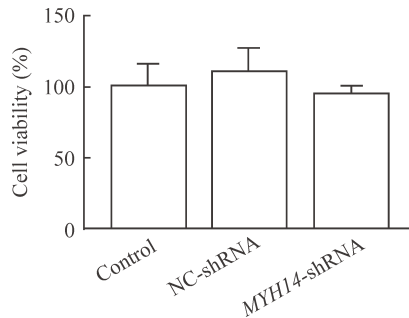


图 4 *MYH14* 下调对大鼠施万细胞 RSC96 活力的影响

Fig 4 Effect of *MYH14* down-regulation on viability of rat Schwann cells RSC96

MYH14: Myosin heavy chain 14; NC: Negative control; shRNA: Short hairpin RNA. $n=3$, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

肌球蛋白家族包括 17 种非常规肌球蛋白和一类含有 3 种非肌球蛋白家族的肌球蛋白^[7]。这 3 种肌球蛋白主要由 *MYH9*、*MYH10* 和 *MYH14* 编码, 分别位于 22、17 和 19 号染色体^[8-10]。*MYH14* 基因位于 19 号染色体, 编码肌球蛋白结合蛋白 C。研究表明相比胚胎发育时期, 成年人或动物组织中广泛高表达 *MYH14* 蛋白^[11]。有研究发现 *MYH14* 在人体脑、心脏、肾脏、肝脏、结肠、小肠、肺和周围神经中均有表达^[8,12-13]。2004 年 *MYH14* 首次被鉴定为神经性耳聋的致病基因^[14]; 随后有学者证实先天性小耳畸形疾病中 *MYH14* 基因表达亦存在异常^[15-16], 但其在周围神经系统中的作用尚未见报道。最近有研究证实 *MYH14* 编码区含有氨基末端肌球蛋白“运动”结构域, 包括肌球蛋白头域、2 个 IQ 结构域和羧基末端肌球蛋白尾域, 其特殊区域对于细胞内水囊泡的运输具有重要作用, 该特殊功能是否协同 AQP1 参与细胞内水分子的运输并作为潜在的治疗靶点值得进一步研究^[11]。本实验拟通过构建 *MYH14*-shRNA 慢病毒载体下调其表达, 为验证 *MYH14* 在施万细胞中对 AQP1 的表达调控作用奠定基础。

RNA 干扰是将 mRNA 编码的同源小靶片段外

缘双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 导入细胞中, 通过一系列细胞内反应特异性降解细胞中的 mRNA, 从而导致相应基因沉默, 是目前研究细胞信号转导通路和基因功能的重要工具^[17-18], 具有高特异性、高效率、可遗传性、可进行多基因研究等特点^[19]。shRNA 是一段具有紧密发卡环的 RNA 序列, 外源性 shRNA 通过特定的载体转染入细胞后发挥特定的沉默效果, 目前常被用于 RNA 干扰^[20]。阳离子脂质体法、电穿孔法、Biolistic 颗粒传递法、慢病毒载体法等为目前常见的细胞转染方法, 其转染效率不同。由于慢病毒载体既能感染分裂活跃期细胞, 又能高效率感染分裂缓慢或非分裂期细胞, 并可携带较大的外源性基因, 且对转录沉默作用有较强的抵抗力, 能长期稳定表达目的基因, 不会导致寄主细胞的死亡, 转染的动物细胞能连续传代, 即使对于稳定转染困难的大鼠单核细胞也能高效感染^[21], 目前已成为体外和体内基因传递的有效工具^[22-23]。

本研究设计出特异性 shRNA 靶点, 通过慢病毒载体将目的基因整合到宿主细胞染色体中, 成功构建了 *MYH14* 干扰载体。通过提取质粒后再转染 RSC96 细胞, 应用蛋白质印迹分析筛选出干扰效能最大的 *MYH14*-shRNA, 为后续实验验证 *MYH14* 对施万细胞中 AQP1 穿梭机制的影响和研究 AQP1 相关信号通路奠定了实验基础。

[参考文献]

- [1] AGRE P, SASAKI S, CHRISPPEELS M J. Aquaporins: a family of water channel proteins[J/OL]. *Am J Physiol*, 1993, 265: F461. doi: 10.1152/ajprenal.1993.265.3.F461.
- [2] WANG H, FANG F, YI J, XIANG Z, SUN M, JIANG H. Establishment and assessment of the perinatal mouse facial nerve axotomy model via a subauricular incision approach[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2012, 237: 1249-1255.
- [3] FANG F, LIU C Y, ZHANG J, ZHU L, QIAN Y X, YI J, et al. Involvement of MAPK ERK activation in upregulation of water channel protein aquaporin 1 in a mouse model of Bell's palsy[J]. *J Mol Neurosci*, 2015, 56: 164-176.
- [4] 李宾. 乙酰唑胺调节雪旺细胞 AQP1 抑制面神经水肿的实验研究[D]. 上海:第二军医大学,2014.
- [5] ZHANG R, VAN HOEK A N, BIWERSI J, VERKMAN A S. A point mutation at cysteine 189 blocks the water permeability of rat kidney water channel CHIP28k[J].

- Biochemistry, 1993, 32: 2938-2941.
- [6] 许丁文,姚伟娟. 细胞骨架对水通道蛋白2穿梭的影响[J]. 生理科学进展,2016,47:287-290.
- [7] BERG J S, POWELL B C, CHENEY R E. A millennial myosin census[J]. Mol Biol Cell, 2001, 12: 780-794.
- [8] LEAL A, ENDELE S, STENGEL C, HUEHNE K, LOETTERLE J, BARRANTES R, et al. A novel myosin heavy chain gene in human chromosome 19q13.3[J]. Gene, 2003, 312: 165-171.
- [9] LALWANI A K, GOLDSTEIN J A, KELLEY M J, LUXFORD W, CASTELEIN C M, MHATRE A N. Human nonsyndromic hereditary deafness DFNA17 is due to a mutation in nonmuscle myosin MYH9[J]. Am J Hum Genet, 2000, 67: 1121-1128.
- [10] BAYAZIT Y A, YILMAZ M. An overview of hereditary hearing loss[J]. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec, 2006, 68: 57-63.
- [11] KIM B J, KIM A R, HAN J H, LEE C, OH D Y, CHOI B Y. Discovery of MYH14 as an important and unique deafness gene causing prelingually severe autosomal dominant nonsyndromic hearing loss[J/OL]. J Gene Med, 2017, 19. doi: 10.1002/jgm.2950.PM:28221712.
- [12] 杨嵘,李浒,詹成雄,冒海燕,詹泰岚,朱正烽,等. 两个有血缘关系的常染色体显性非综合性耳聋家系基因突变分析[J]. 中华医学遗传学杂志,2010,27:259-262.
- [13] GOLOMB E, MA X, JANA S S, PRESTON Y A, KAWAMOTO S, SHOHAM N G, et al. Identification and characterization of nonmuscle myosin II-C, a new member of the myosin II family[J]. J Biol Chem, 2004, 279: 2800-2808.
- [14] DONAUDY F, SNOECKX R, PFISTER M, ZENNER H P, BLIN N, DI S M, et al. Nonmuscle myosin heavy-chain gene *MYH14* is expressed in cochlea and mutated in patients affected by autosomal dominant hearing impairment (DFNA4)[J]. Am J Hum Genet, 2004, 74: 770-776.
- [15] KIM S J, LEE S, PARK H J, KANG T H, SAGONG B, BAEK J I, et al. Genetic association of *MYH* genes with hereditary hearing loss in Korea[J]. Gene, 2016, 591: 177-182.
- [16] 林琳,宋宇鹏,潘博,杨庆华,韩娟,蒋海越. *MYH14* 基因在先天性小耳畸形疾病中的表达研究[J]. 中国优生与遗传杂志,2012,20:13-16.
- [17] STOVALL D B, WAN M, ZHANG Q, DUBEY P, SUI G. DNA vector-based RNA interference to study gene function in cancer[J/OL]. J Vis Exp, 2012: e4129. doi: 10.3791/4129.
- [18] 李劲涛,杨军,张秀丽,谭兴. RNAi 最新研究概况[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2007,23:1077-1079.
- [19] IDREES S, ASHFAQ U A. RNAi: antiviral therapy against dengue virus[J]. Asian Pac J Trop Biomed, 2013, 3: 232-236.
- [20] KHALIQ S, JAHAN S, IJAZ B, AHMAD W, ASAD S, HASSAN S. Inhibition of hepatitis C virus genotype 3a by siRNAs targeting envelope genes[J]. Arch Virol, 2011, 156: 433-442.
- [21] HOHSFIELD L A, GELEY S, REINDL M, HUMPEL C. The generation of NGF-secreting primary rat monocytes: a comparison of different transfer methods[J]. J Immunol Methods, 2013, 391(1/2): 112-124.
- [22] COCKRELL A S, KAFRI T. Gene delivery by lentivirus vectors[J]. Mol Biotechnol, 2007, 36: 184-204.
- [23] 章杰,江华,张盈帆,方帆,宋艳玲,唐乙,等. 小鼠水通道蛋白1基因 shRNA 慢病毒载体构建与鉴定[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2013,29:48-50.

[本文编辑] 曾奇峰