

Noggin 基因沉默表达载体的构建及效果评价

马雨楠, 游颖, 孙兆增*, 曾林*

(军事医学科学院实验动物中心, 北京 100071)

【摘要】 目的 构建慢病毒介导的 *Noggin* RNAi 干扰序列, 并分析这些干扰序列对 *Noggin* 基因的沉默效果。**方法** 针对目的基因 *Noggin* 的 mRNA 设计四条干扰序列, 并将这些序列连接到 Lenti-KD 慢病毒载体, 将重组质粒瞬时转染 HEK-293T 包装细胞, 获得重组慢病毒。将重组病毒感染 MC3T3-E1 细胞, 利用 puromycin 进行筛选, 获得稳定表达细胞系。通过实时荧光定量 PCR 和 Western blot 技术分析不同干扰序列的干扰效果。**结果** 实时荧光定量 PCR 结果显示, 四种干扰序列对 *Noggin* 基因的表达都有一定的沉默效果, 但只有 shNoggin-1 ($P < 0.01$) 对其表达影响显著。Western blot 结果显示, 四种干扰序列中只有 shNoggin-1 ($P < 0.01$) 对 *Noggin* 的表达蛋白具有显著的降低作用。**结论** 获得了一种 *Noggin* 基因的干扰序列, 该序列能够干扰 *Noggin* 基因 mRNA 的稳定性, 从而影响蛋白的表达。该干扰序列可以用于部分敲除 *Noggin* 基因, 从而用于研究 *Noggin* 基因的功能。

【关键词】 *Noggin* 基因; 基因沉默; 表达载体; *Uncv* 无毛小鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016) 01-0037-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.01.007

Construction and evaluation of gene silencing vectors of *Noggin*

MA Yu-nan, YOU Ying, SUN Zhao-zeng*, ZENG Lin*

(Laboratory Animal Center of the Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

【Abstract】 Objective To construct the retroviral-mediated short hairpin RNA (shRNA) expression vectors of *Noggin*, and to analyze the silencing effect of the shRNA. **Methods** Four interference sequences were designed based on *Noggin* mRNA, and connected to Lenti-KD vectors. The recombinant plasmids were transiently transfected into HEK-293T cells, and finally obtained the recombinant virus. Then MC3T3-E1 cells were infected with the recombinant virus and screened by puromycin. The gene silencing effect of shRNA was evaluated using RT-PCR and Western blot. **Results** RT-PCR results showed that all the four interference sequences had silencing effect on the expression of *Noggin*, but only shNoggin-1 ($P < 0.01$) was different significantly. Western blot results showed that among the four interference sequences, only shNoggin-1 ($P < 0.01$) showed a significantly lowering effect on the expression of *Noggin*. **Conclusions** One interference sequence of *Noggin* gene is obtained, which can interfere the stability of mRNA of the *Noggin* gene, by affecting the protein expression. It is useful for the further study of unknown biological function of *Noggin*.

【Key words】 *Noggin*; Gene silencing; Expression vector; *Uncv* hairless mice

Corresponding author: ZENG Lin, E-mail: zenglin1965@126.com. SUN Zhao-zeng, Email: laxszz@aliyun.com

Uncv 无毛小鼠是由于常染色体基因突变导致其毛囊发育缺陷而产生的无毛性状。毛囊发育受多种基因、多条信号通路的协同调控, 主要包括 BMP、

Wnt 和 Notch 等信号通路。*Uncv* 突变引起的小鼠毛囊发育缺陷是有助于研究毛囊发育调控的关键因素。而已有研究资料表明 *Noggin* 基因在毛囊的发

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(31030058), 国家科技支撑计划(2011BA115B03)。

[作者简介] 马雨楠(1989-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 实验动物学。E-mail: mynrr324@126.com。

[通讯作者] 曾林(1965-), 男, 研究员, 研究方向: 实验动物科学, E-mail: zenglin1965@126.com;

孙兆增(1977-), 男, 副研究员, 研究方向: 实验动物分子遗传学, Email: laxszz@aliyun.com。

育过程中发挥了重要作用^[1]。

Noggin 基因最初分离自非洲爪蟾的胚胎,将其 mRNA 注射至爪蟾胚胎,使其头部显著增大,由此命名(美国俚语中 *Noggin* 为“头,脑袋”的涵义)^[2]。在体内 *Noggin* 基因对多个系统的发育和重塑的调控有着重要作用。*Noggin* 与骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)高度结合,阻止其与相应受体的结合,直接拮抗 BMP-2、-4、-7,从而抑制 BMP 作用的信号转导通路^[3]。

本实验借助慢病毒介导的 RNAi 重组载体,对 *Noggin* 基因进行 RNA 干扰,筛选出有效的沉默表达载体,以便于研究 *Noggin* 基因对毛囊形态发育相关信号通路的影响。特别是研究 *Uncv* 无毛小鼠毛囊发育信号通路的调控,分析其在毛囊发育调控中的作用和机理。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂

EndoFree plasmid ezFlow mini kit(PD1220-02)、Gel extraction kit DC3511-01)、EZgeneTM tissue RNA kKit(R6311-01)为 Biomiga 品牌产品,DNA ligation kit(D6022)、PrimeScript RT reagent kit(RR047A)、SYBR[®] Premix Ex TaqTM II 为 Takara 品牌产品,Puromycin(J593)为 Amresco 品牌产品,胎牛血清、DMEM 高糖培养基、0.05% EDTA 胰酶为 HyClone 品牌产品,lipofectamine 2000 转染试剂、高糖 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's)培养基、DMSO 为 Invitrogen 品牌产品,4 × SDS 上样缓冲液、1 × PBS 缓

冲液、1 mol/L Tris-Cl、1.5 mol/L Tris-Cl 为 Solarbio 品牌产品,抗 *Noggin* 兔多克隆抗体(ab16054)为 Abcam 品牌产品,HRP 标记山羊抗兔二抗(CW0103)、HRP 标记山羊抗小鼠二抗(CW0102)、抗 β -actin 鼠单克隆抗体(CW0096)、BCA 蛋白定量试剂盒(CW0014)为康为世纪品牌产品,酵母粉、胰蛋白酶、NaCl 等均为国产试剂。

1.1.2 菌种及细胞株

Lenti-KD 载体、pMD2.0G 质粒、psPAX2 质粒和 HEK293T 细胞由本实验室冻存,MC3T3-E1 细胞购自中国医学科学院基础医学研究所基础医学细胞中心。实验于军事医学科学院实验动物中心屏障动物实验室进行【SYXK(军)2012-004】。

1.2 实验方法

1.2.1 慢病毒介导的 *Noggin* 基因 RNAi 重组载体的构建

(1) *Noggin* 基因 shRNA 靶序列的设计

根据 siRNA 的设计原则,针对目的基因 *Noggin* 的序列,设计四条 shRNA 环形序列。利用网站(<http://www.lifetechnologies.com/cn/zh/home/life-science/rnai.html>)设计出两条互补的小干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA)的模板序列,并以基因 mRNA 为模板设计合成二条 RNAi 特异性靶向序列。采用 Blast 软件对选择的靶序列进行同源分析,排除 shRNA 特异性抑制其他基因片段的情况。再在两条互补的碱基序列的 5' 端分别加入限制性内切酶 *Bam*HI、限制性内切酶 *Eco*RI 的酶切位点。设计的四条 shRNA 寡核苷酸序列见表 1。

表 1 shRNA 寡核苷酸序列表

Tab.1 shRNA oligonucleotide sequence list

名称 Names	序列 Sequences
shRNA-1-forward	5'-GATCCgctgaggaggaagttacagatCTTCCTGTCAGAatctgtaacttctcctcagcTTTTG-3'
shRNA-1-reverse	5'-AATTCAAAAAgctgaggaggaagttacagatTCTGACAGGAAGatctgtaacttctcctcagcG-3'
shRNA-2-forward	5'-GATCCcctaaggagaaggatctgaaCTTCCTGTCAGAttcagatccttctccttagggTTTGTG-3'
shRNA-2-reverse	5'-AATTCAAAAAccctaaggagaaggatctgaaTCTGACAGGAAGttcagatccttctccttagggG-3'
shRNA-3-forward	5'-GATCCcgccagcactatctacacatCTTCCTGTCAGAatgtgtagatagtgctggccgTTTGTG-3'
shRNA-3-reverse	5'-AATTCAAAAAcggccagcactatctacacatTCTGACAGGAAGatgtgtagatagtgctggccgG-3'
shRNA-4-forward	5'-GATCCcgagatcaaaggctggagttCTTCCTGTCAGAaactccagccctttagctctgTTTGTG-3'
shRNA-4-reverse	5'-AATTCAAAAAcagatcaaaggctggagttTCTGACAGGAAGaactccagccctttagctctg-3'

(2) shRNA 载体的构建

设计的寡核苷酸单链由 Invitrogen 公司合成,经退火反应使其变为双链。用限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Eco*RI 双酶切载体质粒 Lenti-KD,将目的片段进行回

收。用 DNA ligation kit 试剂盒连接酶切后的载体片段与退火后的双链 DNA。连接产物转化 DH5 α 感受态细胞,涂到氨苄青霉素平板上培养过夜,菌液 PCR 筛选出阳性克隆由华大公司进行测序。PCR 引物见表 2。

表 2 引物序列表

Tab. 2 Primer sequence list

名称 Names	序列 Sequences
KD-forward	5'-AATGCTCTTTGGATTGGGAATCTTAT-3'
KD-reverse	5'-TGCTCTAACCAGAGAGACCCAGTA-3'
Noggin-forward	5'-GCAAGAAACAGCGCCTGAGC-3'
Noggin-reverse	5'-GAAGCAGCTGCCACCTTCA-3'
Actin-forward	5'-GCTTCTTTGCAGCTCCTTCGT-3'
Actin-reverse	5'-GACCCATTCCCACCATCACA-3'

(3) 慢病毒包装

包装病毒前,种植 293T 细胞 $7 \times 10^5/60$ mm 平皿,种植 5 个平皿,其中一个准备包装对照病毒 shMock,其内所含序列不针对目的基因,没有敲低效果。shMock 内所含序列为 GATCCCCTAAGGTTA-AGTCGCCCTCGCTTCCTGTCAGACGAGGGCGACTTAACCTTAGGTTTTTG。用 lipofectamine 2000 转染试剂进行细胞转染,质粒 pMD2.0G 和 psPAX2 各 $1 \mu\text{g}$ 分别加上质粒 Lenti-KD shMock、shNoggin-1、shNoggin-2、shNoggin-3、shNoggin-4 $1 \mu\text{g}$,进行病毒包装,培养 3 d,收集上清。

(4) 稳定细胞系建立

感染前,种植 MC3T3-E1 细胞 $2 \times 10^5/$ 孔于六孔板。过夜培养后,换含病毒液的培养基(1.5 mL 培养基含 polybrene $15 \mu\text{g}$ + 病毒液 $200 \mu\text{L}$),感染过夜。换新鲜培养基培养 $48 \sim 72 \text{ h}$,通过荧光显微镜,观察病毒感染情况。之后进行药物筛选,加入 puromycin($10 \mu\text{g/mL}$ 终浓度)。亲代细胞加入 puromycin 的已经死亡,病毒感染的细胞,仍大部分存活,收获细胞,进行 Western blot 鉴定。

1.2.2 Noggin 基因沉默表达效果的鉴定

(1) 实时荧光定量 PCR 检测 Noggin 基因干涉效果

根据 GenBank 中 β -actin 基因和 Noggin 基因编码区序列,通过 Primer Premier 5.0 软件进行引物设计,和 NCBI 中 Blast 序列比对功能,初步检测引物的特异性。引物序列见表 1.2。用 Ezgene™ Tissue RNA Kit 试剂盒提取样本中总 RNA,测定 RNA 浓度后,用 PrimeScript RT reagent Kit 试剂盒进行反转录。按照 SYBR® Premix Ex Taq™ II 试剂说明书进行扩增。扩增程序为 95°C 60 s , (95°C 15 s , 60°C 15 s , 72°C 45 s) $\times 40$ 个循环,每组样本均设 3 次重复。由溶解曲线判定 PCR 反应的特异性,根据标准曲线以及荧光曲线的 Ct 值计算定量结果。使用 SAS 统计软件处理实验数据,得到四条干扰序列对

目的基因 mRNA 的敲低效果。

(2) Western blot 检测 Noggin 干扰效果

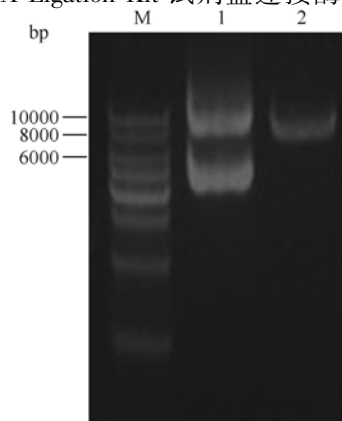
向收取的细胞沉淀中加入混好蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液,充分吹打混匀,置于冰上裂解 20 min , $14\,000 \text{ r/min}$ 4°C 离心 10 min ,吸取上清液。用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度,加适量 $4 \times \text{SDS}$ 上样缓冲液,煮沸 10 min 。待配制好的 12% SDS-PAGE 凝胶干后,每孔加入等质量蛋白,最左侧加入彩色预染蛋白 marker,恒压 100 V 电泳后,恒流 250 mA 转膜。封闭 1 h (封闭液用 5% 脱脂奶粉),按需要裁膜,目的蛋白膜加入 $1:1000$ 稀释的抗 Noggin 兔多克隆抗体,内参蛋白膜加入 $1:5000$ 稀释的抗 β -actin 鼠单克隆抗体, 4°C 孵育过夜。用 TBST 洗膜三次,每次 8 min 。分别加入对应的 $1:8000$ 稀释的二抗,室温孵育 1.5 h 。同样用 TBST 洗膜三次,每次 8 min 。将膜拼好后,逐滴加混合好的发光 AB 液,反应 1 min 后去除即可显影。

2 结果

2.1 PCR 鉴定构建的 shRNA 载体

用限制性内切酶 BamHI 和 EcoRI 对载体质粒 Lenti-KD 进行双酶切鉴定,得到目的片段(图 1)。目的片段大小在 $6000 \sim 8000 \text{ bp}$,与预期结果 7853 bp 基本符合。酶切前由于质粒的超螺旋,会看到两条带,经过酶切质粒被线性化,而酶切切下的片段很小,电泳看不到。将 shRNA 克隆入 EcoRI 和 BamHI 双酶切产生的切口。

用 DNA Ligation Kit 试剂盒连接酶切后回收的



注:M:1kb ladder marker;1:Lenti-KD 质粒;
2:BamHI,EcoRI 双酶切后的质粒。

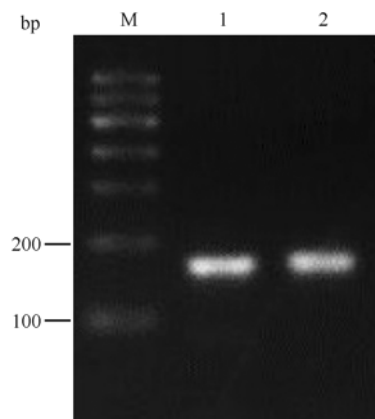
图 1 Lenti-KD 载体双酶切鉴定

Note. M: 1kb ladder marker; 1: Lenti-KD plasmid;

2: The product of plasmid Lenti-KD digestion with BamHI and EcoRI.

Fig. 1 Enzyme digestion analysis of the plasmid Lenti-KD

载体片段与退火后的双链 DNA, 将连接产物转化到 DH5 α 感受态细胞, 用菌液 PCR 方法筛选出阳性克隆(图 2), 阳性克隆得到 170 bp 的 PCR 产物, 阴性克隆得到 105 bp 的产物, 或者因为重组没有产物。筛选出的阳性克隆送华大公司测序进行进一步的验证, 测序结果正确。



注: M: 700 DNA marker; 1, 2: 重组质粒阳性克隆。

图 2 重组质粒 PCR 鉴定结果

Note. M: 700 DNA marker;

1, 2: The PCR product of recombinant plasmid.

Fig. 2 The PCR products of recombinant plasmid

2.2 包装的慢病毒感染 MC3T3-E1 细胞荧光观察

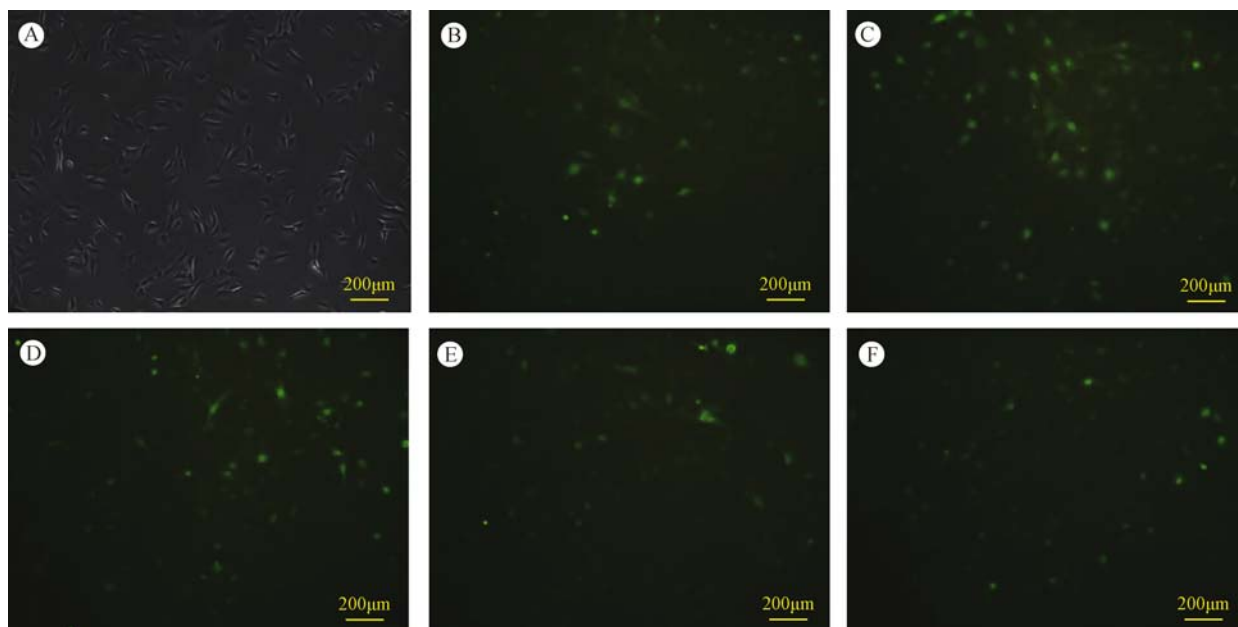
用 293T 细胞包装的慢病毒感染 MC3T3-E1 细胞, 感染过夜, 换新鲜培养基培养 48 ~ 72 h 后, 通过荧光显微镜, 观察病毒感染情况(图 3)。可以明显观察到荧光, 表明感染成功。之后进行药物筛选, 得到稳定细胞系。

2.3 实时荧光定量 PCR 检测 *Noggin* 基因干涉效果

通过 IQ5 荧光定量 PCR 仪自带软件的数据以 β -actin 为内参, 用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的方法处理数据和 Graph-PAAd Prism 5 软件作图, 结合 SAS 9.2 分析软件得到以下数据(图 4), 表明 shNoggin-1 ($P < 0.01$) 差异有显著性、shNoggin-2 ($0.01 < P < 0.05$) 和 shNoggin-3 ($P < 0.05$) 差异有显著性、shNoggin-4 ($P > 0.05$) 差异无显著性, 其中 shNoggin-1 干涉效果最佳。

2.4 Western Blot 检测 *Noggin* 干扰效果

RNAi 在哺乳动物的细胞中是由于靶基因 mRNA 水平的降低引起靶蛋白表达水平的降低。为了确定干涉后蛋白表达变化是否与 mRNA 表达相似, 选择 *Noggin* 多克隆抗体, 用 Western blot 的方法分析蛋白表达水平的变化(图 5 A), 并通过 Photoshop 7.0 灰度分析软件, 结合 SAS 9.2 分析软件得到以

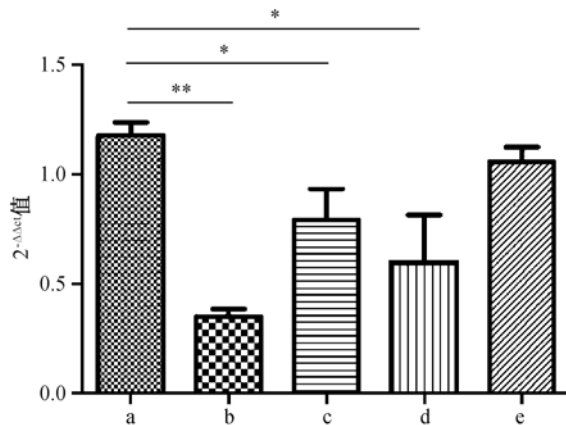


注: A: 正常 MC3T3-E1 细胞; B: 阴性对照病毒 shMock 感染 MC3T3-E1 细胞; C-F: 病毒 shNoggin-1、shNoggin-2、shNoggin-3、shNoggin-4 感染 MC3T3-E1 细胞。

图 3 慢病毒感染 MC3T3-E1 细胞荧光观察($\times 100$)

Note. A: MC3T3-E1 Cells; B: MC3T3-E1 cells with negative virus infection; C-F: MC3T3-E1 cells infected with different viruses (c: shNoggin-1; d: shNoggin-2; e: shNoggin-3; f: shNoggin-4).

Fig. 3 Fluorescence observation of the MC3T3-E1 cells infected with Lenti virus($\times 100$)



注: a; shMock 阴性对照; b-e; 干扰序列 shNoggin-1、shNoggin-2、shNoggin-3、shNoggin-4; ** $P < 0.01$ 与 shMock 阴性对照组相比差异有显著性, * $P < 0.05$ 与 shMock 阴性对照组相比差异有显著性。

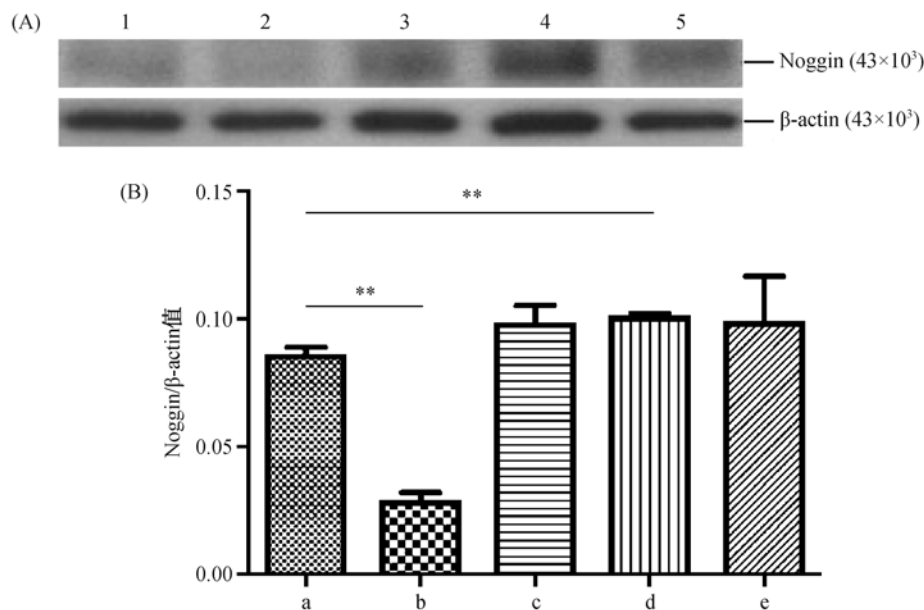
图 4 实时荧光定量 PCR 检测 *Noggin* 基因干扰效果
Note. a: Negative sequence; b-e: Different Interference sequences (b: shNoggin-1; c: shNoggin-2; d: shNoggin-3; e: shNoggin-4); ** $P < 0.01$ means extremely significant difference compared with the negative control, * $P < 0.05$ means significant difference compared with the negative control.

Fig. 4 Identification of *Noggin* gene interference effect using RT-PCR

下数据(图 5 B)。Western blot 结果显示,设计的 4 条干扰序列中, shNoggin-1 ($P < 0.01$) 差异有显著性, shNoggin-2 和 shNoggin-4 ($P > 0.05$) 差异无显著性, shNoggin-3 ($P < 0.01$) 虽差异极显著但并非表达量下降,其中 shNoggin-1 干扰序列的干扰效率最高,与实时定量 PCR 的结果相似。

3 讨论

在体内 *Noggin* 基因对多个系统的发育和重塑的调控有着重要作用。*Noggin* 与 BMP 高度结合,阻止其与相应受体的结合,从而抑制 BMP 作用的信号转导通路, BMP 主要是通过经典的 Smad 路径传导信息,发挥其生物学作用^[4]。BMP 家族成员参与毛囊发育的各个环节,主要起抑制作用。*Noggin* 基因在 BMP 信号通路中通过抑制 BMP 信号,促进毛囊的发育; *Noggin*-Shh 信号能调节毛发的形态,能促进诱导毛囊的生长^[1]。BMP 信号通过调节细胞周期循环调节胚胎和神经组织发育^[5]; 其抑制剂 *Noggin* 在神经系统发育及分化中也有重要作用,能促使脑及神经组织的发育,且在背侧中胚层缺失时直接诱发出神经组织,因而 *Noggin* 被认为是较有前途的内



注: A: 1; shMock 阴性对照; 2-5; 干扰序列 shNoggin-1、shNoggin-2、shNoggin-3、shNoggin-4; B: a; shMock 阴性对照; b-e; 干扰序列 shNoggin-1、shNoggin-2、shNoggin-3、shNoggin-4; ** $P < 0.01$ 与 shMock 阴性对照组相比差异有显著性。

图 5 Western Blot 检测 *Noggin* 干扰效果

Note. A: 1: Negative sequence; 2-5: Different Interference sequences (2: shNoggin-1; 3: shNoggin-2; 4: shNoggin-3; 5: shNoggin-4). B: a: Negative sequence; b-e: Different Interference sequences (b: shNoggin-1; c: shNoggin-2; d: shNoggin-3; e: shNoggin-4); ** $P < 0.01$ means extremely significant difference compared with negative control.

Fig. 5 Identification of *Noggin* interference effect using Western blot

源神经信号^[6]。*Noggin* 是骨骼系统发育所必需的重要调控基因,人们研究发现正常的关节、韧带、软骨形成需要正确而适当的 *Noggin* 及 BMPs/CDMP 表达^[7,8]。此外已有的研究显示,以 BMP 抑制剂 *Noggin* 干预 MC3T3-E1 细胞,并加机械离心力刺激后,抑制了 Runx2 的表达,阻断 BMP 信号通路^[9],提示 MC3T3-E1 细胞与 BMP 信号通路密切相关。为了便于敲低 *Noggin* 后对 BMP 信号通路的研究,我们选用 MC3T3-E1 细胞获得能有效抑制 *Noggin* 基因表达的稳定细胞系。

RNA 干扰是最初由 Andrew 发现线虫体内 mRNA 由特异的双链 RNA 介导产生降解,基因表达受其正义 RNA 抑制的现象^[10]。Tuschl^[11]发现 RNA 干扰能够特异性高效沉默哺乳动物细胞内靶基因。RNAi 是 Dicer 酶在胞质中剪切长双链 RNA 生成 21–25nt 的双螺旋分子 siRNA,其双螺旋结构能被参与 RNA 干扰的分子特异识别,其中一条单链能与 RNA 诱导沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC)结合形成蛋白复合物,该复合物可切断与 siRNA 互补的 mRNA 分子或靶基因翻译的过程,进而抑制相应基因在细胞内的表达^[12]。因此, RNAi 近些年多用于未知基因生物学功能的研究,迅速成为发展前景广阔且实用的生物技术。本实验利用 RNA 干扰技术对 *Noggin* 基因进行 RNA 干扰,从而研究 *Noggin* 基因对毛囊干细胞形态、分化和对相关信号通路的影响,分析其在毛囊发育调控中的作用和机理。

慢病毒载体是一种复制缺陷性逆转录病毒载体,具有可插入细胞基因组、稳定表达、持续时间长、对细胞活性要求低、包装周期短等优点,因此成为携带干扰 RNA 的理想载体^[13],使 RNAi 干扰作用持久性表达。siRNA 技术是利用具有同源性的双链 RNA 诱导沉默序列特异的目的基因,并迅速阻断该基因的活性,从而观察该基因对细胞的影响。近年来,有关慢病毒载体介导 RNAi 的相关研究^[14]逐渐展现在研究内源性基因功能和基因治疗中该技术的重要作用。本实验所采用的慢病毒载体 Lenti-KD,以其自身 RNA 为模板在宿主细胞内反转录合成 cDNA,再以后者为模板合成双链 DNA,环化,整合在宿主细胞的染色体内,进而能够得到长期的表达。

本研究成功构建了小鼠 *Noggin* 基因慢病毒介导的 RNAi 载体,并转染小鼠 MC3T3-E1 成骨细胞,得到有效抑制 *Noggin* 基因表达的稳定细胞株,为后续研究 *Noggin* 基因对毛囊形态发育的相关信号通路的影响,分析其在毛囊发育和调控中的作用和机

理提供依据。结果发现,sh*Noggin*-1 干扰效率最高,其明显下调了 MC3T3-E1 细胞中 *Noggin* mRNA 和蛋白的表达,与对照组之间差异有显著性($P < 0.01$)。干扰载体构建成功,为进一步检测敲低 *Noggin* 基因对相关信号通路的影响提供基础。

参 考 文 献

- [1] Song K, Krause C, Shi S, et al. Identification of a key residue mediating bone morphogenetic protein (BMP)-6 resistance to noggin inhibition allows for engineered BMPs with superior agonist activity[J]. J Biol Chem, 2010, 285(16): 12169–12180.
- [2] Smith WC, Harland RM. Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in *Xenopus* embryos[J]. Cell, 1992, 70(5): 829–840.
- [3] Zimmerman LB, De Jesus-Escobar JM, Harland RM. The Spemann organizer signal Noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4[J]. Cell, 1996, 86(4): 599–606.
- [4] Islam SS, Mokhtari RB, Kumar S, et al. Spatio-temporal distribution of Smads and role of Smads/TGF- β /BMP-4 in the regulation of mouse bladder organogenesis[J]. PLoS ONE, 2013; 8(4): 61340.
- [5] Oshimori N, Fuchs E. Paracrine TGF- β signaling counterbalances BMP-mediated repression in hair follicle stem cell activation[J]. Cell Stem Cell, 2012, 10(1): 63–75.
- [6] Lamb TM, Knecht AK, Smith WC, et al. Neural induction by the secreted polypeptide Noggin [J]. Science, 1993, 262(5134): 713–718.
- [7] Brunet LJ, McMahon JA, McMahon AP, et al. Noggin, cartilage morphogenesis, and joint formation in the mammalian skeleton [J]. Science, 1998, 281(5368): 1455–1457.
- [8] Li CH, Yang X, He YJ, et al. Bone morphogenetic protein-9 induces osteogenic differentiation of rat dental follicle stem cells in P38 and ERK1/2 MAPK dependent manner[J]. Int J Med Sci, 2012, 9(10): 862–871.
- [9] 关键, 程宗生, 王健平, 等. 成骨细胞中 Runx2 对机械离心力刺激的响应 [J]. 华西口腔医学杂志, 2010, 28(1): 38–40, 44.
- [10] Fire A, Xu S, Mello CC, et al. Potent and specific genetic interference by double stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. Nature, 1998, 391(6669): 806–811.
- [11] Hamilton AJ, Baulcombe DC. A species of small antisense RNA in post transcriptional gene silencing in plants [J]. Science, 1999, 286(544): 950–952.
- [12] Novina CD, Sharp PA. The RNAi revolution [J]. Nature, 2004, 430(6996): 161–164.
- [13] Wizniewski M, Trono D. Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector mediated drug inducible RNA interference [J]. J Virol, 2003, 77(16): 8957–8961.
- [14] Hui EK, Yap EM, An DS, et al. Inhibition of influenza virus matrix (M1) protein expression and virus replication by U6 promoter driven and lentivirus mediated delivery of siRNA [J]. J Gen Virol, 2004, 85(Pt7): 1877–1884.

[收稿日期] 2015-07-14