

分类号:

学 号: 20182113004

密 级: 公开

单位代码: 10759

石河子大学

硕士学位论文



湖羊 ZFY 基因干扰载体及外泌体介导对 性别控制的影响

学 位 申 请 人

武 赞

指 导 教 师

贾 斌 教授

房文斌 高级兽医师

申 请 学 位 类 别

专 业 硕 士

专 业 名 称

农 业

研 究 领 域

畜 牧

所 在 学 院

动物科技学院

中国·新疆·石河子

2020 年 11 月

分类号：
学 号：20182113004

密 级：公开
单位代码：10759

石河子大学

硕 士 学 位 论 文



湖羊 ZFY 基因干扰载体及外泌体介导对 性别控制的影响

学 位 申 请 人	武 赞
指 导 教 师	贾 斌 教 授
	房文斌 高级兽医师
申 请 学 位 类 别	专 业 硕 士
专 业 名 称	农 业
研 究 领 域	畜 牧
所 在 学 院	动 物 科 技 学 院

中国·新疆·石河子

2020 年 11 月

**The effects of RNAi vectors for interfering *Zfy* gene and
exosome on sex control in Hu Sheep**

A Dissertation Submitted to
Shihezi University
In Fulfillment of the Requirements
for the Degree of
Master of Agriculture

By
WuYun

(Animal Husbandry Science)

Dissertation Supervisor: Prof. Jia Bin

Nov, 2020

石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

学位论文独创性声明

本人所呈交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名：武赞

时间：2020年11月25日

使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名：武赞

时间：2020年11月25日

导师签名：



时间：2020年11月27日

摘要

动物的很多经济性状都受到性别的限制，比如产奶、产蛋性状等，再如产肉等性能对于不同的性别，动物的表现也不同，这时就需要对动物的性别来进行控制，随着生物工程领域的快速发展，人们逐渐摸索出一些动物的性别控制方法。通过性别控制技术，可以极大地提升经济效益，减少不必要的成本浪费如饲料成本，并且可以加快动物的育种进程。

湖羊母羊具有繁殖率高，母性好，四季发情的特点，且其多产双羔，可利用该特性来与其他品种优良的公羊杂交获得大量后代，故对于湖羊，我们更期望产出后代为雌性。所以本试验利用了 RNAi 技术对湖羊 *Zfy* 基因进行干扰沉默，从而控制后代性别。

目的：本试验拟通过睾丸注射 *Zfy* 基因外泌体干扰载体，观察湖羊后代性别比例，探究外泌体作为 *Zfy* 基因干扰片段的载体的可行性，为性别控制方法提供一个新的选择方法。

方法：（1）无菌采取湖羊血样，用试剂盒法提取、提纯外泌体。

（2）构建 5 种湖羊 *Zfy* 基因外泌体干扰载体，分组进行细胞水平的干扰试验，通过 qRT-PCR 检测 *Zfy* 基因 mRNA 表达量变化。

（3）使用细胞水平试验效果最好的 C 组进行睾丸注射，设对照组注射 pLL3.7-C，待母羊产羔后统计分析后代性别比例。

结果：（1）在细胞水平试验中，有两组外泌体干扰载体显著地抑制了 *Zfy* 基因的表达，最好的效果表达水平降低了 32.6%。

（2）试验组母羔率为 56.6%，对照组为 68.6%，试验组显著低于对照组；试验组母羔平均初生重为 2.81 ± 1.153 kg，公羔为 3.01 ± 1.021 kg，对照组母羔平均初生重为 2.81 ± 1.247 kg，公羔为 3.00 ± 1.174 kg，两组差异不显著。

结论：成功构建了湖羊 *Zfy* 基因干扰载体，对 *Zfy* 基因产生了显著干扰效果，但在动物水平进行干扰试验却没有取得预期结果，分析其原因：1.外泌体载体封装率有限且本身不能进行复制导致注射睾丸的有效剂量较小；2.由于外泌体保存不当影响最终结果。

关键词：性别控制；*Zfy* 基因；外泌体；RNAi；绵羊

Abstract

For many economic traits such of animals such as milk production and egg production, they are restricted by gender, and the performance of meat production is also different for different genders. At this time, it is necessary to control the sex of animals. With the rapid development of bioengineering, some animal gender control methods have been explored. Sex control can greatly improve economic efficiency, reduce unnecessary cost wast such as feed costs, and accelerate the process of animal breeding.

Female Hu sheep has the characteristics of high reproductive rate, good maternal nature, they can be estrus all year round, and most Hu sheep have multiple birthsmore, this feature can be used to hybridize with other good varieties of male sheep to obtain a large number of offspring. Therefore, for Hu sheep, we are more expected to produce female offspring. In this experiment, RNAi technology was used to interfere *Zfy* gene of Hu sheep to control the sex of offspring.

Objective: To observe the sex ratio of Hu sheep, exosome carriers for interfering *Zfy* injected into testis, and we explore the feasibility that exosomes as carrier interfere *Zfy* gene, and provide a new selection for gender control methods.

Methods: (1) We collected blood samples of Hu sheep aseptically, and used the kit method to extract and purify exosomes.

(2)We constructed five groups exosome carriers for interfering *Zfy* gene of Hu sheep,then did experiments of the cellular level,and detected expression of *Zfy* gene mRNA by qRT-PCR.

(3)We used group C which is the best in cell level test for testicular injection, and used the pLL3.7-C as the control group .We analyzed the sex ratio of offspring after the ewe has given birth.

Results: (1) At the cell level, two groups exosome carriers significantly inhibited the expression of *Zfy* gene, and the expression level of the best effect was reduced by 32.6%.

(2) The rates of female lambs of the experimental group was 56.6%, which was significantly lower than that of the control group (68.6%). The average birth weight of female lambs was 2.81 ± 1.153 kg, and that of male lambs was 3.01 ± 1.021 kg. While in the control group, the average birth weight of female lambs was 2.81 ± 1.247 kg, and that of male lambs was 3.00 ± 1.174 kg. There was no significant difference between the two groups.

Conclusion: Exosome vectors were successfully constructed for interfering *Zfy* of Hu sheep, which had a significant interference effect on *Zfy* gene, but in the interference test of animal level did not achieve the expected results. There are two reasons for this experience: 1. The limited carrier rate of exosomes and the inability to replicate themselves resulted in a small effective dose of testicular injection.; 2. The final result is also affected by improper preservation of exosomes.

Key words: sex control; *Zfy* gene; exosome; RNAi;sheep

目录

摘要.....	I
Abstract.....	III
目录.....	III
缩略词.....	VI
第一章 绪论.....	1
1. 研究目的及意义.....	1
2. 性别控制技术.....	1
2.1 概述.....	1
2.2 <i>Zfy</i> 基因与性别控制.....	1
2.3 性别控制途径.....	2
3. RNA 干扰.....	4
3.1 概述.....	5
3.2 原理.....	5
3.3 构建和应用.....	6
4. 外泌体.....	7
4.1 外泌体概述.....	8
4.2 外泌体调节生物功能的作用及机理.....	8
4.3 外泌体载药的类型和途径.....	11
5. 总结与展望.....	13
6. 研究内容与技术路线.....	13
第二章 试验研究.....	15
试验一 湖羊 <i>Zfy</i> 基因外泌体干扰载体的构建及细胞水平检测.....	15
1. 材料与方法.....	15
1.1 主要试剂与仪器.....	15
1.1.1 主要试剂.....	15
1.1.2 主要仪器.....	16
1.2 试验材料.....	16
1.3 siRNA 表达载体的选择.....	16
1.4 siRNA 序列的设计.....	16
1.5 双链 siRNA 的合成.....	17
1.6 siRNA 重组表达载体的构建.....	17
1.6.1 外泌体的提取纯化.....	17
1.6.2 外泌体透射电镜观察.....	17
1.6.3 外泌体的载药.....	17
1.7 细胞水平试验.....	17
1.7.1 溶液的配制.....	17
1.7.2 培养湖羊睾丸生精细胞.....	18
1.7.3 细胞水平的干扰效果检测.....	18
1.8 数据分析.....	19
2 结果与分析.....	19
2.1 siRNA 序列设计.....	19
2.2 外泌体透射电镜观察结果.....	20

2.3Zfy 基因 mRNA 表达水平检测结果.....	20
3.讨论.....	21
4.小结.....	22
试验二 湖羊体内干扰试验.....	23
1. 材料与amp;方法.....	23
1.1 试验材料.....	23
1.2 试验方法.....	23
2.结果与分析.....	23
2.1 后代性别比例.....	24
2.2 后代初生重.....	24
3.讨论.....	24
4.小结.....	25
第三章 结论.....	26
参考文献.....	27
致 谢.....	30
作 者 简 介.....	31
石河子大学硕士研究生学位论文导师评阅表.....	32

缩略词 Abbreviation

英文缩写	中文名称	英文全称
bp	碱基对	base pair
cDNA	互补链 DNA	Complymentary DNA
FCM	流式细胞术	Flow cytometry
mRNA	信使核糖核酸	messenger ribonucleic acid
PBS	磷酸盐缓冲液	phosphate buffered saline
PCR	聚合酶链式反应	Polymerase Chain Reaction
qRT-PCR	荧光相对实时定量	Quantitative real time polymerase chain reaction
RISC	RNA 介导的沉默复合体	RNA-induced silencing complex
RNAi	RNA 干扰/沉默	Interference on mRNA expression level
RT-PCR	反转录聚合酶链式反应	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
sgRNA	小向导 RNA	small-guide RNA
shRNA	小发卡 RNA	small hairpin RNA
siRNA	小干扰 RNA	small interference RNA
TDF	睾丸决定因子	Testes determining factor

第一章 绪论

1. 研究目的及意义

性别控制指经人为干预使动物更多地产生出人们预期性别的后代的生物技术,可以显著提高家畜的繁殖效率。实现哺乳动物的性别控制是全世界生命科学工作者研究的重点,该技术对于动物核心育种群的建立、提高其群体的遗传稳定性、保种和育种和提高种群数量意义重大,通过充分发挥家畜的性别优势作用可以大大增加所需产品产量,提高与动物性别密切相关的生产性能,从而给养殖场带来更高的经济效益。因此利用现代生物技术控制家畜后代的性别对于动物的实际生产十分重要,在畜牧业中的意义非常重大。目前,实现性别控制的手段有三大途径:一、受精前 X、Y 型精子分离;二、妊娠选择;三、改变生殖道环境。第一种方法多通过流式细胞仪来实现,但使用精子分离方法成本高,分离速度低,对精子损伤较大,缩短精子的存活期且受精率低,胚胎性别鉴定多用于实验室分析,实际应用困难,成本高,且伤害母畜,而第三种方法尚在探索阶段,效果不良。本实验团队结合 RNAi 技术,对 X 或 Y 型精子的形成发育进行干扰,在受精前从源头对动物的性别进行人为控制。

在羊养殖生产中,性状良好的种羊可以给养殖场良好的经济回报,而湖羊母羊具有繁殖率高,母性好,四季发情的特点,且每胎多羔,多产双羔、三羔,故对于湖羊,我们更期望产出后代为雌性,利用该特性来与其他品种优良的公羊杂交获得大量优良后代。

本研究针对湖羊 *Zfy* 基因设计干扰片段,利用 RNAi 技术将外泌体作为载体干扰沉默 Y 型生殖细胞中的 *Zfy* 基因,降低其 mRNA 的表达水平,获得更多的母羔,从而达到控制后代性别的目的,为绵羊的性别控制及动物的遗传育种与繁殖提供新的科研思路,也为其他家畜及特种经济动物在受精前进行性别控制提供了一个研究模型。

2. 性别控制技术

2.1 概述

性别控制指利用人工的手段干预其正常的生殖过程,使动物更大几率地产出人们所预期的性别后代的一门生物工程技术。在现代医学方面,通过该技术可以很大程度地减少某些疾病的发生,一些病只会伴随着性染色体传给特定性别的后代,利用该手段,怀孕的女性通过孕检鉴定胚胎即可判断胎儿是否患有某些疾病,并决定是否淘汰带病后代,避免该类疾病的发生^[1]。而在养殖业,该技术可以有效扩大动物伴性的生产性状的经济效益,对于产奶产蛋动物,我们更希望产出更多的雌性后代,从而减少浪费资源,并且效益会更高;而对于肉用动物,雄性个

体的生产性能更优，肉质更好，雄性后代在生产中更有利。同时该技术在动物育种中也十分重要，利用该技术，增加选种强度，最终加快育种进程。

2.2 Zfy 基因与性别控制

1902 年，科学家发现了性染色体的存在，同年经过 Mc Clung 对蝗虫精细胞的研究，性别决定的染色体理论问世，自此性染色体决定性别的学说逐渐形成，1923 年，Painter 发现人类 X、Y 型染色体的存在，且卵子与 Y 型精子结合发育为男性，反之则发育为女性^[2]，Jacob 等人于 1959 年将 XXY 型染色体与 XY 型染色体相比对，提出了 Y 染色体在初级性别决定中的重要作用^[3]。1988 年，Page 等人^[4]发现至少能够编码 13 个锌指结构的具有 140 kb 的高度保守序列，命名为 Zfy。Zfy(Y. chromosome. linked. Zinc-finger. protein.transcriptional.factor)被称为与 Y 染色体相关的锌指蛋白转录因子，是位于 Y 染色体短臂上能够编码锌指蛋白的基因，其基因家族还包括 X 染色体上 Xq21-22.3 的 Zfx 和位于常染色体上的 Zfa，该基因家族对 DNA 和 RNA 起特异性的转录调控作用，故人们用其进行哺乳动物的性别鉴定^[5]。Zfy 基因曾被当做是睾丸决定因子 (Testis Determining Factor, TDF) 的候选基因，直到 SRY 基因被发现才推翻，相关研究发现，Zfy 基因与哺乳动物的单倍体生精细胞的更新分化和发育息息相关，对于减数分裂和精子生成至关重要^[6]，并且其编码的蛋白上具有特定 DNA 的结合位点，可以特异性地结合靶基因并引导其穿过核膜定位于精子的细胞核内，参与精子的形成发育。

2.3 性别控制途径

目前人们用常五种方式来实现性别控制：基因调控、受精前 X、Y 精子分离、受精后胚胎性别鉴定技术、妊娠选择以及环境控制。

2.3.1 基因调控

主要是利用基因打靶技术，从基因的角度切入，对动物后代性别进行控制。在通过对能够决定性别的基因片段进行删减、插入或添加，也可以利用分子生物学技术调控基因的复制、转录和翻译，使动物朝着理想的性别方向发展，达到性别控制的目的。在精子发生过程中，雄性生殖细胞的基因表达与其他细胞几乎拥有一致的特性，在性别控制的相关研究中^[7]，该过程共受三个层次的调控。首先在转录水平，这一阶段对于基因表达有着非常重要的作用；其次为翻译水平，对于其他细胞来讲翻译水平并不是最主要的阶段，但是对于生殖细胞来讲，这个阶段发挥着更加有力的作用，尤其是在减数分裂后的蛋白质合成的过程中，如靶向雄性特异基因鱼精蛋白基因，较大可能性会获得雄性后代。而第三层次的翻译后调控则是通过蛋白质修饰实现的，并且影响精子发生过程中的前两个阶段。以雄性生殖细胞为基础的遗传程序具有三个重要特征：一是在漫长的进化过程中一直保留减数分裂和精子发生；二是在雄性生殖细胞发育过程中会特异性地表达一些特定的基因和转录；三是这些特异性的表达在不同的发育阶段会有所不同。

2.3.2 X、Y 精子分离途径

这是一种可以在受精前预先选择后代性别的新颖生物繁殖技术。它颠覆了自然界长期形成的定律：受精时后代性别的随机性。目前，学界基于 X、Y 精子的生理、免疫和生物学方面的差异并加以利用。针对于这方面，邱海芳^[8]等人在文章中总结了多种方法，如下：

(1) 沉降法

事实上研究表明沉降法并不是一个理想的方法，该方法主要利用 X 精子比 Y 精子沉积快的原理^[9]。当实验人员让绵羊的精液静置 2 小时，并用上层精液使母羊受精，产母羔率为 63%。另外，使用这种方法处理牛的精液，并收集到含有丰富 X 精子的部分进行牛的授精，结果表明，产母犊率约为 65%。沉降方法基于 X、Y 型精子不同的比重，但差异并不显著，且由于精子发育的不同阶段从而导致实验数据不准确，并未受到学界大部分人的认可。

(2) 电泳法

精子的膜电荷有多少含量由唾液酸与核蛋白产生反应所决定，且 X 和 Y 精子膜电荷的分布位置有所不同，X 精子的膜电荷多居于头部，而 Y 精子的尾部电荷居多。在中性缓冲电泳的实验过程中，相比 Y 型精子、X 精子更多数地向阳极移动。所以，可以利用不同型精子的表面电荷的差异，将 X 和 Y 精子进行分离^[10]，但该方法在实验结果中同样不够准确，且重复性差。

(3) 免疫学分离法

这种方法主要是基于 X 和 Y 精子对免疫反应的识别作为理论基础，试验表明其起到重要作用的免疫抗原是 H-Y 抗原^[11]。在漫长的进化过程中，H-Y 抗原皆处于被保存留的状态。除某些过渡型外，所有异配子的体细胞中均存在 H-Y 抗原，但只有 Y 精子可以将其表达。所以，精子也同样分为两种，分别是 X 型精子和 Y 型精子。然而，虽然用免疫学方法分离精子由于处理程序复杂且时间长导致精子活力降低而影响了妊娠率，在实际中推广仍有较多困难。

(4) 流式细胞分离法

该方法利用流式细胞仪对目标精子进行测定，其原理为基于 X 精子 DNA 含量高于 Y 精子的理论基础利用不同型精子间的差异进行分离，Y 精子吸收更多的染料并产生更强的荧光。通过仪器和计算机系统对发射信号进行放大，对 X、Y 精子进行分析和分离。现学者大多数均看好流式细胞分离法。在性别控制的相关研究上有多种方法，目前哺乳动物的性别控制主要有两种方法，一种是传统型的在受精后对后代性别进行检测，并作出取舍^[12]，而另一种便是受精前的预先选择技术。基于 X、Y 精子在不同方面的不同，目前拥有许多方法可将其区分和分离，从而有针对性的选择需要的精子。但在现有的方法中，流式细胞仪能够产生最好的效果，甚至准确率可达到 93% 以上，由此也可看出其巨大潜力与前景。

2.3.3 胚胎性别鉴定

早期胚胎的性别鉴定一直是众多生物学者关注的重点，他们希望可以通过实

验研究, 实现在性别鉴定后将目的性别的胚胎移植至受体体内, 从而来进行性别控制。鉴别胚胎主要通过细胞遗传学、生物化学、免疫学等手段确定, 采用 PCR 技术对移植前的胚胎性别进行鉴定, 准确率可达 100%。此外, 基于胚胎细胞特异表达产物的生化鉴定也受到了越来越多的关注, 目前胚胎性别相关的鉴定技术发展的已经十分成熟。目前已试剂盒可以快速地鉴定胚胎性别, 这在很大意义上帮助缩减了检测操作难度和耗费的时间, 这不仅解决了改良家畜遗传资源不足的问题, 而且代表着该领域研究迈出的一大步, 为研发转基因动物和人医方面进行性别选择提供了很大的便利。

2.3.4 妊娠选择

发育趋于稳定后, 胚胎在母体中逐渐发育为胎儿, 怀孕 10 周后, 利用 B 超成像技术可以清楚地鉴定胎儿性别^[12]。可观察到不同性别个体的生殖器官。通过羊膜穿刺后鉴定羊水, 鉴定效果较好。在畜牧业中, 可以选择符合预期性别的胎儿, 让其继续发育直至分娩, 对于不符合预期性别的胎儿使其流产、停止妊娠, 借此控制后代性别, 但这并不适用于人胎的法律规定及伦理。

2.3.5 环境控制

在多种途径中, 有一种仍在摸索阶段的方法: 环境控制方法, 这是目前学界在摸索和研究的新方向, 主要的方法有摄入一定的微量元素镉对 Y 精子的发育产生抑制反应、体外受精实验时控制和调节培养液内的试剂浓度、时间、激素水平等。元素镉与性别有着一定的相关性, 通过多个以小鼠、家兔和猪为样本的临床试验结果为证。杨海^[13]用酸诱导法分离王氏管中的 X、Y 精子, 最终得到约 73% 的 X 精子, 并测定 pH 值为 5.5 对 X 精子有较好的诱导效果。但它仍然需要大量的实验来验证使用环境条件来控制动物和人类的性别。在妊娠动物的食物中添入了一定量的镉。经过一段时间的作用后, 发现产出的后代雌性居多。结果表明, 当镉元素积累到一定量时会使睾丸生精小管上皮细胞出血坏死, 进而影响精子的发育和活力, 而 X 精子具有较强的抵抗力, 故其有较高的存活率和较多的受精机会, 所以后代中有更多的雌性。

3. RNA 干扰

近些年, 在生命科学领域中取得最重大的研究成果之一便是 RNA 干扰 (RNAi), 且在近十年来被多次应用于动物的性别控制上如小鼠、兔子及猪、羊等, 并取得了良好的成效。为性别控制技术又提供了一种新的方法。

RNAi 是指 mRNA 表达被小分子双链 RNA 能够特异性地降解或抑制, 而进一步抑制或关闭特定基因的表达^[14]。在学者们把握了其中一种的致病基因后, 便可以利用其 mRNA 制造出一类小分子干扰 RNA, 用于治疗相关疾病。理论上讲, 基本任何一种与特异性基因表达相关的疾病都可以通过 siRNA 来治疗, 甚至是癌症、家族遗传史等疑难杂症。因此, RNAi 一直吸引着学术界的目光, 被判定为当前最热门的领域、最有未来前途的新药开发领域。

然而, 由于仅在 14 年前 RNAi 现象才刚刚被发现, 国内外学术界还缺乏最为有效的 siRNA 载体, 这极大地限制了 RNAi 技术实验成果、药物研究等技术应用。当前市面上常用的 siRNA 转染试剂多为脂质体类的载体, 它可以将 siRNA 转染到体外培养的多种细胞株中, 但在原代细胞和悬浮细胞的转染方面并没有很好的成效。并且由于是脂质体转染剂, 对培养细胞也会带来一定的毒剂影响。在不断的研究下, 学者们提出要打破传统的脂质体的使用方法, 以纳米聚合物为材料对细胞几乎没有毒性, 大多数细胞系的转染效率可以达到 90% 以上。此外, 研究表明, RNA 转染试剂和核酸混合后可以直接注入进动物体, 完成体内 RNA 干扰实验。

3.1 概述

20 世纪 90 年代初, 分子生物学领域发现了反义单链 RNA 能抑制 mRNA 的表达, 学界中一般均认定其与内源性双链 RNA 酶的作用有关。在那时, 科学家便已经在对植物的相关研究中得知了基因沉默表达。当时, 研究小组想让矮牵牛花变得更暗更亮。所以他们把一个叫做查尔酮合成酶的基因植入矮牵牛花。这种基因主要的作用是控制矮牵牛花色素沉淀的蛋白质。它通常使花变成粉红色或紫色^[15]。但他们没有料到, 实验的结果显示他们并没有得到预想中的矮牵牛花颜色, 反而是出现了白色品种, 这令他们感到非常奇怪。经过后来的检测结果表明, 转基因花中查尔酮合成酶的浓度比正常花低半百倍, 因此猜想到可能是外源基因同时也对植物内源基因表达产生了抑制作用。这个谜底直到近 10 年后才揭晓。美国的生物科学方面的学者再次证实了线虫的基因沉默现象。他们的研究成果是, 分别将正义 RNA、反义 RNA 和双链 RNA 分别注入线虫体内后, 发现作为对照添加的双链 RNA 对基因表达有明显抑制作用, 单链反而没有。结果表明, dsRNA 对于靶基因的表达产生着重要的影响, 并且能够高效率的降低其活性。当时, 这一不同于常理的发现, 也遭到大多数人的反对和质疑。直至 21 世纪, 经过科学家们对 21 个核苷酸的 dsRNA 作用研究, 实验证实同样的现象也可能发生在哺乳动物细胞后才平息了这场风波。

除此以外, 基于载体的 siRNA 技术能够稳定有效地抑制哺乳动物细胞中某一基因的表达, 这有利于研究者长期对靶基因进行功能研究和基因治疗。国外学者们利用多功能载体构建了 shRNA 表达文库^[16]。另外, 后发现了 5 个参与 p53 途径的新基因。对于一些显性遗传病, 从双亲那里遗传一个突变基因就足够了。另外, 研究表明在保持正常拷贝过程中并不产生影响的同时, 还能够沉默其中一个基因, 这个实施起来的可行度是较高的。基于基因的 SNP 信息, 利用 siRNA 对致病等位基因进行选择性的沉默, 为基因治疗提供了新的途径^[17]。

3.2 原理

siRNA 是指双链 RNA 进入细胞后被分割形成的片段, 这个过程中, RNA 会被一种核酶切割成小分子, 之后它将与细胞质内的 RNA 诱导沉默复合体相结合,

解旋为单链,反义链会引导 RISC 结合其相应互补的 mRNA, 并将其降解, 以完成整个沉默。详细来讲的话, 根据现人们总结并公认的 RNAi 的作用机制: 第一步是激活 dsRNA 内切酶 (Dicer), 它可以将 dsRNA 加工成 21-25nt 的正、反义链, 即 siRNA。在第二步中, 反义 siRNA 是另一个 RISC 的引导链, 介导反义链与靶 mRNA 分子互补区的切割, 以起到干扰基因表达作用。RISC 包括从 dsRNA 获得的 microRNA 的多种蛋白质组分, 包括核酸内切酶、核酸外切酶、螺旋酶, 是一种用于寻找同源序列的活性物质。Dicer 在进化过程中十分保守。该酶需要能量来引导 dsRNA 通过该区域的去调节酶和起到催化作用^[18]。siRNA 可在 RdRp 的作用下合成以靶 mRNA 为模板的 dsRNA, dsRNA 被切割成新的 siRNA 再次循环, 出现基因沉默现象。

3.3 构建和应用

在生物学中, RNA 干扰在被发现后不断进行着深入研究, 学者们已经大致把握了其作用机理和生物性功能, 这也将为之后广泛的应用打下了坚实的基础, 在微生物学、功能基因组学、信号转导等专业领域取得了非常大的进展, 另外, 应用在医学、畜牧和农业领域的发展也常常被看好。

在 RNAi 技术发展前, 如果人们想研究反向遗传学, 便仅能依靠于基因敲除技术, 但由于其在实验中难度系数高、操作复杂等缺点, 基因敲除并不能作为一种方便的研究手段。目前的 RNAi 技术实现了更高水平的进展, 能够进行高通量筛选。而这都得益于 siRNA 表达文库方法的建立^[19]。在寻找信号转导途径和新的药物靶点等方面产生了重大影响。RNAi 具有较高的序列特异性和有效的干扰活性, 是功能基因组学研究的不可或缺的工具。RNAi 可以特异性地沉默特定基因以使其功能丧失或突变。在实验中, 学者们发现 RNA 干扰可以有效的对动物体内特定基因的表达产生抑制作用, 并且能够控制其表达时间, 对任何发育阶段都进行控制, 产生和基因敲除相同的沉默效果。同时, 相比较原本的基因敲除技术, 该技术拥有很多优势如实验周期较短、所需人员少、便于操作等。

近些年来, RNAi 多次成功构建转基因动物模型, 更标志了其在基因功能研究的重要地位。由于其顽强的抗病毒特性、抑制转座子活性和防止自私基因序列增殖过快等功能^[20], RNAi 可用于生产抗病毒动植物, 而 dsRNA 对应于不同病毒转录序列中的高同源片段可用于抵抗不同类型的各类病毒。还有些实验则是利用 RNAi 技术抑制 HIV、乙型肝炎等病毒中与人类基因组无同源性的序列, 在减少病毒受体的复制或作用的同时尽可能避免对正常组织产生的副作用, 目前这些 RNAi 药物的研发已逐步进入临床试验阶段。RNAi 也广泛应用于害虫防治。在通过 RNAi 载体的特性, 将某些害虫生长所必需的基因的 dsRNA 转移到植物中, 导致害虫在摄取植物为食物的同时也获取到了 siRNA, 从而抑制害虫的生长或存活。未来在后基因时代这项技术将有宽阔的前景, 可应用在多种领域中, 并且引起了生物医学研究中产生一种新的技术革命。截至目前为止, RNAi 技术尚在发

展过程中，以下将列举其的具体应用。

(1) 在园艺作物的应用

自发现 dsRNA 诱导的基因沉默和了解植物中的各种 sRNA 来源以来，许多转基因或基于病毒的基因沉默技术已被发展用来人工诱导植物中的 RNA 沉默，特别其中的是 hpRNA 和人工 miRNA 已被应用于相应的研究、基因工程和作物改良中。RNA 沉默技术，特别是 HPNA 转基因技术和最新的 amiRNA 技术已被广泛应用于研究基因功能、产生病原和害虫抗性，且通过调控代谢途径基因在各种模式和作物中的表达来改善其他农艺性状^[21]。科学家们研究了 RNAi 在植物中的各种应用方式，以改善品质性状、营养、控制病虫害、抵抗病毒和使开花形状、颜色和气味变化，最终应用于市场，如第一个在现实中使用的西红柿 (flavr-savr)，它的设计可以延长保质期，在九十年代被引入市场。

(2) 在治疗癌症的应用

血癌基因产生的原因主要是由于染色体易位，如 BCR/abl 融合基因。mRNA 转录后的异常融合区是理想的 RNAi 靶点，并且该设想已被证实存在白血病细胞中。此外，RNA 干扰抑制某些内源性基因的表达，还可以促进白血病细胞株的凋败、死亡或增加其对化疗药物的反应能力。癌基因 k-rasv12 及其产物 k-ras 蛋白是多种人类肿瘤发生的必要基础和条件。病毒介导的 RNAi 可以通过抑制或阻断其表达来抑制肿瘤的发生。RNAi 还能抑制多种肿瘤细胞中其他癌基因的表达，如 P19、HeLa 和 c33a、U2OS 和 MCF-7^[22]。导致肿瘤的主要原因是基因之间相互形成网络的调控作用。原有的技术并不能完全有效地抑制单个癌基因的生长，也不能成功阻断、逆转肿瘤生长的结果。癌症基因中的片段均保持着高度一致的序列，因此 RNAi 正可利用了这一点，通过为该序列设计并注射 dsRNA 分子，可以达到同时剔除多个基因的效果。RNAi 不仅是研究 VEGF 亚型功能的新工具，而且可能在 VEGF 特异性抑制治疗中发挥重要作用。

(3) 在动物卵母细胞中的应用

Wianny 等人^[23]首次利用 RNAi 技术探究小鼠卵母细胞基因的特异性表达，将针对于 c-mos 基因的 siRNA 转染小鼠的卵母细胞，其实验结果与敲除该基因的效果相同，为后来利用 RNAi 技术进行相关研究提供了新思路 and 借鉴之处。Xu 等人^[24]将针对于三磷酸肌醇 I 型受体基因的靶向 siRNA 对小鼠卵母细胞进行转染，成功地使该基因的表达被沉默，再一次证实了 RNAi 技术在研究动物生殖中的可行有效性。

(4) 在动物精子发生中的应用

Shaoji 等^[25]首次应用 RNAi 技术来研究小鼠精母细胞的形成过程，且通过实验发现了编码 DNA 重组酶的内源性基因 DMC1 在精子形成过程的重要作用。为后来探究在精子形成过程中相关基因的作用提供了新方法。Williams 和 Schultz^[26]用 RNAi 技术进一步证实磷脂酶基因对睾丸的重要作用，并提出该基因的表达缺失是造成男性不育症的主要原因之一。Bettencourt 等^[27]针对人类精细胞中的葡萄

球菌激酶应用 RNAi 干扰技术,成功抑制了其表达,结果导致中心体的复制受阻,最终无成熟精子。而 Rao 等^[28]用 RNAi 技术进行小鼠试验,成功沉默了威尔氏瘤基因表达,精子粘附支持细胞受阻,几乎完全丧失受精能力。

4.外泌体

外泌体由多种细胞分泌,可以进行通讯和物质传递,在各个细胞间充当着“天然运输使者”的角色。随着蛋白质类药物在生物领域中发挥的作用越来越举重若轻,一些不可忽视的缺陷也同时暴露了出来,如其分子量大、不稳定、给药途径有限等。各种蛋白质药物载体应运而生,但这些载体的免疫原性高、包封率低、不稳定等缺陷限制了应用。外泌体具有良好的生物相容性、低免疫原性、毒性低等特性,正在成为蛋白质载药系统发展中重要的一环,在靶向传送蛋白质药物作用中发光发热。其与 RNA 干扰结合也同样能够发挥奇效,承担载体的作用。由于其种种优势,可以很大程度地提高运输物质对细胞的转染率,起到更加良好的效果。

4.1 外泌体概述

外泌体是由质膜出芽产生的细胞外囊泡,存在于体液中。其粒径尚无标准,大部分文献反应其粒径在 40nm—120nm,粒径为 90-120nm 的细胞外囊泡都被成为外泌体,而那些粒径为 60-80nm 或更小的则被定义为小外泌体。现在的研究成果表明几乎所有的细胞能够分泌外泌体,它几乎存在于生物体所有的组织、细胞间隙和体液中,属于胞外囊泡类^[29]。此外,异质性是外泌体的一大特点,在不同部位分泌的外泌体在功能上会存在着很大的差异,即便是由同一细胞分泌出来的也不例外。收到细胞外的刺激、微生物的攻击和其他应激的条件会促使外泌体产生。学者们普遍认为其形成方式与其他的普通微泡有着很大区别。

外泌体主要由蛋白质、核酸和脂质三部分组成。外泌体主要含有两种蛋白,一种是膜蛋白,又分为两种,一是涵盖在几乎所有外泌体中的蛋白质,可作为不同于其它囊泡(EVs)的标记物,例如 CD9、CD63、CD81、CD326。另一种膜蛋白与生俱来的特异性是由于其由特定细胞分泌。例如, A33(来自结肠上皮细胞)、MHC-II、CD86 和乳凝集素(未成熟树突状细胞),这些膜蛋白质主要作用于从普通细胞或特异性细胞中分离外泌体^[30]。而外泌体所携带的膜内蛋白,则主要包括热休克蛋白家族、代谢类的酶、核糖体蛋白、信号转导因子、粘附因子、细胞骨架蛋白以及泛素。

DNA 与 RNA 是外泌体内的核酸的重要组成部分。其中, RNA 主要作用于靶细胞,外泌体内的 RNA 主要包括 mRNA, microRNA(功能性)和 ncRNA。microRNA 之所以有功能性特质是由于其能够起到调节细胞内 RNA 及蛋白的作用,并且对细胞的形态和功能造成影响。目前的学界均公认 RNA 常与疾病发生相关,并且,其中当属 microRNA 在外泌体相关研究中最深入。

4.2 外泌体调节生物功能的作用及机理

外泌体的分泌进程主要伴随着三个方面,许多研究已然证实,外泌体有助于细胞内通讯、免疫调节和细胞间调节等方面^[31],能够帮助细胞浸润、促进细胞生长、刺激血管生成、免疫逃逸、抗药性等,帮助其各种细胞的稳定和完整。相关的实验表明外泌体发挥作用的机制或有两种途径,第一类是利用其原有自体干细胞的微环境,通过对信号通路的调控进而达到对受体细胞进行激活的作用,有效地促进干细胞实现分裂及增殖;第二类则是利用与受体细胞的融合,通过将其中物质释放入受体细胞中,实现对干细胞的增殖、分化、迁移、凋亡。

外泌体存在于几乎所有的细胞中,且被多种不同类型细胞所产生,同时外泌体也广泛存在于所有体液当中,例如滑膜液,母乳,血液,尿液,唾液,羊水和血液中等,因此,在细胞间的通讯和触发生理反应作用中,外泌体是必不可少的一环。当人们研究外泌体功能时,首先发现的是外泌体在细胞的成熟过程能够其运载不必要的蛋白质成分。简单来讲,它们是天然的运输工具,旨在调节受体细胞的生物功能,外泌体在细胞与细胞间,将蛋白质, RNA, DNA 和脂质等进行输送。另外,不同的外泌体通常会受到其内外环境、受体细胞等各种因素的影响,从而在不同的组织内部产生不一样的反应或作用。以下列举了几种近年来学界研究发现的成果,其外泌体在几大方面产生的作用:

(1) 肌肉生长: 由骨骼肌所分泌的外泌体有利于促进肌肉的发育、再生,在肌肉萎缩的恢复中同样也发挥着重要的功能。外泌体对于修复肌肉损伤有着非常大的潜能,在受损的骨骼肌中,生长因子在炎性细胞和基质细胞中被分泌出来,利用外泌体及其为主要运输工具的 microRNA,均可有效地促进肌肉的平衡生长与纤维化^[32]。

(2) 骨细胞: 通过骨组织细胞分泌的外泌体,将其作为传输工具以装载蛋白质、miRNAs 等多种活性物质,能够促进骨的形成以及平衡骨细胞的吸收^[33]。例如来自 MSC 的外泌体可以直接对骨细胞进行调节和调控,将纤维、蛋白等基质附着于表面,以此对骨细胞产生影响。

(3) 母胎及胚胎间交流: 在胚胎与母体子宫内膜之间同样外泌体也发挥作用,另外,其功能也发生在体外培养的多个胚胎之间。现有研究表明外泌体与胚胎共培养,胚胎有更好的生长发育效果,且外泌体为胚胎进行信息交流提供介质,如蛋白质、神经递质、miRNA 和其他分子等均可以用外泌体来运载^[34]。针对于胚胎细胞分泌的含 miRNAs 外泌体及其含量的研究发现,外泌体的功能有可能预测到胚胎发育状况和妊娠结局。当 miRNA 通过受体细胞的靶基因表达对细胞功能进行调控时,很大可能会影响到妊娠的最终结局^[35]。但这研究成果是否合理可靠,并且能否有力证明其确实产生了显著影响,还需要制定后续的实验研究。

(4) 结核杆菌: 外泌体作为信息传递介质,为机体免疫细胞的信息传送做出了重要贡献。在结核分歧杆菌感染后,外泌体可作为巨噬细胞特异性抗原的载

体, 具有免疫原性的抗原将通过外泌体分泌释放发挥作用, 从而激活 T 淋巴细胞, 使机体启动免疫途径^[36]。

(5) 皮肤损伤、抗老: 从目前的研究成果分析, 人类皮肤细胞所分泌的外泌体与常用的视黄醇或干细胞相比效果更为突出, 因此学者们正在研究是否可以通过对人真皮成纤维细胞的培养从而获得更多的外泌体应用于更广泛的临床治疗。在相关的光老化裸鼠实验中, Cheng 通过对照试验, 测试了在 3D 生长的外泌体与维生素 A 乳膏、2D 生长的外泌体、MSCs 外泌体之间的对比。其中 MSCs 近年来被广泛适用于抗皮肤老化, 是一种基于干细胞的治疗方法。其结果显示, 通过这几种方案的治疗后, 皮肤厚度和胶原蛋白均产生了明显改善。其中, 3D 外泌体的效果最为突出, 比起未做过任何处理的小鼠皮肤, 厚度改善效果可以高于其五分之一, 而 MSC 处理的小鼠比未做处理的小鼠皮肤仅仅高了 1%, 而 2D 外泌体的主要突出优势在于促进胶原蛋白的产生, 仅与 MSC 处理的皮肤相比就高出了近 30%^[37]。

外泌体主要有三种发挥途径: 第一个分泌外泌体的细胞膜上的配体结合于受体细胞膜上的受体, 以达到传递信息的目的; 二是与受体细胞融合后释放其内含的信号因子和核酸, 在释放过程中传递信息; 三是将在还未到达受体细胞时释放内容的物质作用于受体细胞表面的受体^[38]。

(6) 外泌体在心血管系统中同样有着重要的地位, 现有文献表明外泌体可在促进血管新生发挥作用, 这是指在现有的血管基础上生成新生血管的过程^[39]。在这个过程中, 外泌体主要是通过 microRNA 对细胞功能的调控作用, 从而促进血管的产生。如通过靶向 cullin2 作用的 miRNA-424, 通过非翻译区域阻碍抑制剂表达的 miRNA-125a 等方法来对血管生成产生积极作用。另外, 大鼠股骨头坏死的相关实验结果表明, VEC 能够增强形成血管的能力, 且经过 NO 释放物处理; 源自 ESC 的 MSC 外泌体在治疗小鼠样本的心肌缺血和减少再灌注损伤时同样具备着非常有效的作用。

(7) 外泌体在免疫系统的调控功能中, 主要以直接作用的方式来调控。外泌体除了促进靶细胞启动下游信号之外, 也会对于 miRNA 进行介导调节。胎盘外泌体表面存在胎盘组织表达的 Fas 配体与肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体, 在靶细胞接触到这些信号后引发 T 细胞的凋亡, 以维持妊娠的正常进行^[40]。另有研究成果显示, 胎盘外泌体的 miRNA 主要由 C19MCmiRNA 这一成分组成, 能够诱导病毒进行自我吞噬或对其快速繁殖速度起到抑制效果, 从而减少外界对胎儿的感染可能性。另外, 利用外泌体的运输功能, 趋化因子受体 CCR5 也被应用于治疗人类免疫缺陷病毒感染的相关研究及临床^[41]。

(8) 针对于神经系统, 外泌体最有利用价值的特点便是其消除大脑中的一些废弃物质, 加强大脑的活动频率, 从而防治退行性疾病的产生, 减少患病人群。外泌体参与疾病的发病过程, 并帮助神经的生长和保护。例如, 脑组织的炎症主要是由于小胶质细胞和星状胶质细胞中所含的促炎细胞因子和金属蛋白酶破坏

血—脑屏障所导致^[42]。而在对老鼠为样本的实验中发现脂肪干细胞所分泌的外泌体能够有效促进损伤后周围神经的再生，而其机制可能与减少 SCs 凋亡、抑制自噬和减轻神经 Waller 变性有关^[43]。

4.3 外泌体载药的类型和途径

有学者怀疑外泌体是否会与细胞相结合发生作用，截止到目前为止，还没有人发现调控外泌体细胞结合的相关具体机制。然而，值得注意的是结合过程始于外泌体对 PM 上特异性受体的识别。若要外泌体产生反应首先需要实现细胞膜受体对外泌体的识别，很大可能通过激活受体进而打开信号通路。在外泌体被内吞或者与 PM 融合后，释放信息因子并直接作用于受体细胞上。

外泌体拥有着许多特点，其中比较突出的便是其穿过细胞质膜等屏障这一特性，这使它成为理想的治疗传递分子。并且，外泌体最常被提到的另一特性便是运输功能，它们稳定的循环和很好的生物相容性支撑着其作为药物递送载体的天然首选。目前许多的医疗临床实验都需要利用外泌体的此项特性来发挥作用，被广泛利用于递送化学、DNA、核酸等各类物质。

4.3.1 外泌体给药途径

给药途径是所需疗效是否可以真正实现的决定因素之一。外泌体拥有着许多方式来进行传输载药功能，但最常见的方式是通过静脉给药，通过增强其渗透性和 EPR 效应，静脉注射的药物在动物中是产生有一定作用的^[44]。

除此以外，通过外泌体来进行药物的配送还具有一个极大的好处，那便是可以轻易到达其他方式所无法接近的肿瘤部位，且现在已成功用于多种途径。但目前，通过外泌体治疗的最主要疗法是进行瘤内注射。利用其运载特异性，直接外泌体注射于病变部位以输送药物作为治疗。

4.3.2 外泌体递送药物的优势

目前的纳米微粒递送系统被发现一些问题，但是相比较下，外泌体可以作为更好的生物分子运载工具。许多如蛋白质或核酸等新的候选药物，在体内环境的表现中极不稳定，这也将对治疗效果产生重大的不利影响，可谓是目前遇到的重大挑战。鉴于目前许多纳米颗粒给药系统存在的问题，外泌体便作为优秀的纯天然载药系统，允许传输生物分子。具有体积小且其自身便为细胞产物等优势的外泌体，在载药过程中可有效避免被巨噬细胞吞噬或降解，还可在体内长时间循环以维持药效^[45]。其中，外泌体拥有可以跨越血-脑屏障向中枢神经系统输送特定药物的能力，这也是外泌体在药物传递输送过程中的非凡优势。

4.3.3 外泌体载药类型

(1) 小分子物质：姜黄素、多巴胺等元素可以通过外泌体可以被有效传递，囊泡内包裹着姜黄素的抗炎活性是单纯递送姜黄素的 3 倍以上。用电穿孔法将 DOX 负载到 iRGD 肽功能外泌体中的转载药物效率高达近 20%^[46]。其中，正是由于 iRGD 肽的作用，导致外泌体针对于肿瘤细胞的靶向性和防治性被表现出

来。若希望抑制该细胞的发育和发展,可以通过 PTX 装载到 MSC 分泌的外泌体中。另外,在姜黄素的相关研究成果中,其被定义为是一种含有天然多酚且抗炎、抗肿瘤以及抗氧化的成分。在样本小鼠的肿瘤细胞实验中,显示出 EL-4 产生的外泌体与姜黄素融合后便会分离出携带有姜黄素的外泌体。而这种外泌体与原本的样本相比较显示出了更强的抗炎作用携带。这进一步表明,外泌体在携带小分子物质等具有携带疏水性药物有着良好的能力。

(2) 蛋白质类:蛋白质药物这一分类中,主要有着酶、多肽和细胞因子三种。由于其特殊的药理作用,现已成为研究的重要目标以及广泛适用于治疗疾病的重点药物。但相反,由于其分子量大、稳定性差的特性,在一定程度上限制了其临床应用。

外泌体可以携带的蛋白质种类很多,作用于靶向给药和稳定酶活性等^[47]。方式有直接与间接两种,文献表明不同方法导致不同载药量,但其中差别仅为五分之一,并不是特别显著。与其他的一些传输载体如纳米粒子和脂质体相比,外泌体的载药量处于二者之间,虽不如纳米粒子的剂量高,但由于其具有生物相容性、渗透性、低免疫原性和低毒性等方面的突出优势,使其成为学者们公认的在未来发展空间与潜力巨大的药物载体^[48]。

①间接载药:在间接给药系统中,将靶蛋白核酸转染到供体细胞中,待其表达后,将细胞分离纯化,以得到目标蛋白的外泌体介导系统。是药物载体的主要方式。

②直接载药:这种方式是指不利用细胞培养的基础上,进行外源性蛋白的输入,且主要某种化学或物理作用。如今,由于其周期短、操作简单、过程可控性强等多种优势,直接载药法的未来被生物科学界所看好。其主要方式有几种,涵盖皂苷处理、孵育、冻融循环、超声和挤压等多种方法。在众多的方法中,目前皂苷辅助药物装载法最为普遍。若想要构建载带 β -葡萄糖醛酸酶的外泌体递送系统, β -葡萄糖醛酸酶可在不破坏外泌体整体结构的情况下,以温和、高效的方式装载到外泌体中。但事实上,这些途径也存在着各自的问题,例如:孵育法的载药量太低导致没有过多的利用价值,而冻融循环法、挤压法等方法则是需要高标准的仪器,并且在过程中可能会对外泌体结构进行不可逆破坏,以影响最终的实验结果,甚至导致无法实验目标药物装载量。在对这多种方法一一进行比对实验后,研究表明,应用皂苷法等方式运送外泌体的效果更好,载量更多、释放能力更强,防蛋白酶破坏能力也良好^[49]。电穿孔方法是利用外泌体输送药物的常用途径,目前在这方面最成功的实验便是将大分子卟啉负载到癌细胞所分泌的外泌体中。

(3) 核酸等基因药物:研究成果发现,外泌体自身携带 miRNA、siRNA 等遗传基因进入靶细胞,从而在生物体内和致病过程中诱导基因修饰,该特性已经成为利用外泌体进行基因治疗和研究的主要方式。(1) siRNA 递送:siRNA 具有不稳定的特性,在体内的循环过程中极易降解。因此,外泌体对其的作用就是

帮助其成功的被递送至靶细胞而不被降解。(2) miRNA 递送: 外泌体本身便携带 miRNA, 因此非常适合作为传递至靶细胞的治疗载体^[50]。关于携带 RNA 药物的外泌体, 如 miR-26a、长非编码 RNA (lncrna) -H19、miR-200b 等则可主要用于抗肿瘤、糖尿病创伤等药物治疗研究的应用。并已证实携带 RNA 的外泌体可能在未来可以发展成为一种治疗多种疾病的基因疗法。另外, 由于多种独特的优势, 使得化学药物成为在外泌体靶向载药进程中的首选, 如经过微流控技术纯化的紫杉醇载药外泌体靶向给药系统用于抗肿瘤治疗, 用于治疗艾滋病相关神经系统疾病等的茛地那韦外泌体载药方式等。目前, 学界针对于外泌体载体核酸和化学药物的基础研究较为普遍, 但临床上尚未使用外泌体载体相关药物。有部分学者建立了大规模生产工程化外泌体的标准操作流程, 并对其保质期、体内分布及毒理学特性等方面进行了详细的探讨。研究核酸对靶向癌细胞的功能将为临床治疗的后续应用打下基础。

5. 总结与展望

RNAi 这项技术将人们带入了更深层次的分子细胞世界, 使人们对其功能有了更多的认识和理解, 也为基因治疗等提供了强有力的新工具。可以预见, 未来 RNAi 技术在基因治疗和应用中发挥重要作用, 对整个生物学理论领域产生重大而深远的影响。性别决定涉及到多个基因之间的相互作用, 是一个相对复杂的过程, 尽管人们对许多性别相关基因的结构和功能有了初步的了解, 但许多基因的特异信号传导途径和机制仍需更多方向的研究, 利用外泌体作为基因载体, 为性别控制的研究提供了新的研究思路, 从而为我们在自然界有性生殖的相关探索过程中提供更多的依据。

6. 研究内容与技术路线

前期实验团队已克隆获得湖羊 *Zfy* 基因的 mRNA 序列, 根据 siRNA 设计原则, 使用网络在线设计工具设计干扰片段, 经过 BLAST 比对特异性选出干扰序列, 送至上海生物工程公司合成 siRNA, 用 PCR 仪合链。于石河子市牛羊定点屠宰场采取湖羊血样, 用试剂盒法提取提纯外泌体并送往新疆医科大学进行电镜观察。将干扰片段用电穿孔方法包装于外泌体内构建外泌体干扰载体, 制构建干扰载体以备用。

采集湖羊的睾丸组织, 用酶消化法分离睾丸中的生精细胞, 建立体外细胞培养体系, 细胞饥饿处理后加入外泌体干扰载体, 经过培养后提取细胞 RNA 并反转录, 利用 qRT-PCR 方法检测 *Zfy* 基因的 mRNA 相对表达量, 选择其中出效果最佳的干扰载体。使用效果最好的干扰载体于五家渠皇牛养殖基地进行体内实验, 用已制得的睾丸针剂对种公羊进行睾丸注射, 每隔 10 天注射一次, 连续注射 3 次, 做好公羊的饲养管理, 进行配种, 待母羊产羔后记录羔羊性别、初生重等数据。技术路线如图 1 所示:

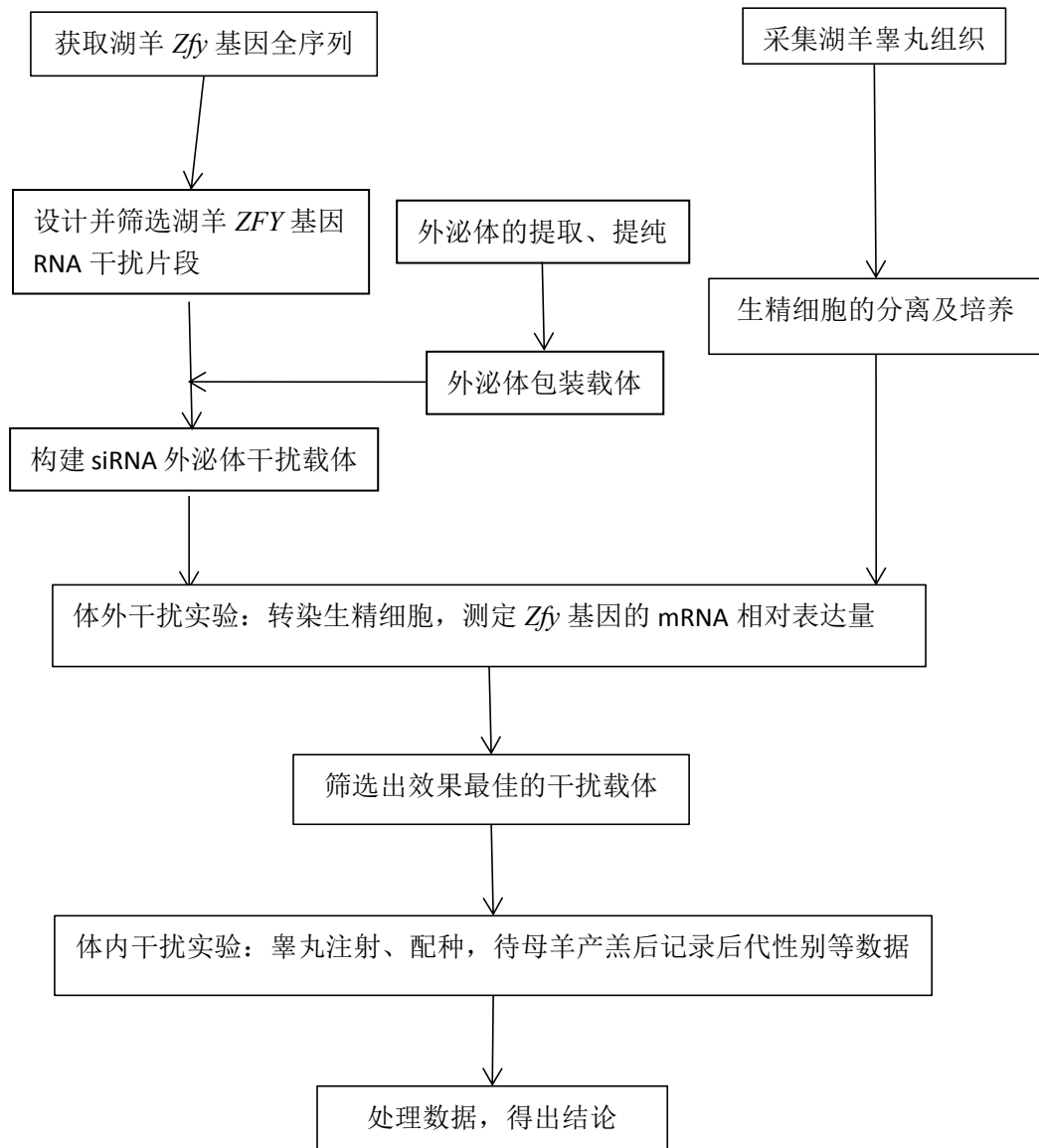


图 1. 技术路线图

第二章 试验研究

试验一 湖羊 *Zfy* 基因外泌体干扰载体的构建及细胞水平检测

Zfy 基因是与 Y 染色体上锌指蛋白相关的基因，位于 Y 染色体的短臂上。和精子的形成息息相关，它曾被认定为 TDF 的候选基因，但被随后 SRY 基因的发现打破，但 *Zfy* 可以特异性地激活精子变态过程中某些特定基因的转录，同样对精子发生有着重要影响。

RNAi 技术现已在生物领域被广泛利用，成为研究基因的主要工具，RNA 干扰能否有效可行取决于 siRNA 能否有效地与靶 mRNA 特异性结合，所以 siRNA 的设计是否具有特异性、高效性以及载体的选择是否理想十分重要，慢病毒虽转染效果良好，但安全性是人们在使用时的最大顾虑。外泌体作为当前研究热点，被发现其具有天然、稳定、能穿过生物屏障、免疫原性低、无毒性等众多可作为载体的特点，故本试验结合 RNAi 技术欲探究外泌体能否作为 siRNA 的载体对湖羊 *Zfy* 基因产生干扰作用。

本试验设计并人工合成针对湖羊 *Zfy* 基因的 siRNA 序列，并将其包装于外泌体中，构建 *Zfy* 基因外泌体干扰载体，用其转染体外培养的湖羊生精细胞，用 qRT-PCR 检测细胞中 *Zfy* 基因 mRNA 的表达水平，筛选出效果最佳的 *Zfy* 基因外泌体干扰载体，以便进行下一步的湖羊体内干扰试验。

1. 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

1.1.1 主要试剂

试剂	生产厂家
寡聚核苷酸序列 (ULTRAPAGE 纯化)	上海生物工程有限公司
T4-DNA 连接酶	上海生物工程技术有限公司
PBS	北京索莱宝科技有限公司
RNA 反转录试剂盒	大连宝生物工程有限公司
琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒	上海捷瑞生物工程有限公司
SYBR Green 定量 PCR 反应混合液	美国 ROCHE
TransExo TM Serum/Plasma Exosome Kit	北京全式金生物技术有限公司
胎牛血清	美国 Gibco 公司
DMEM/F12 培养基	美国 Gibco 公司
双抗	美国 Amresco 公司
透明质酸酶	美国 Sigma 公司
表皮生长因子	美国 Peprotech 公司

总 RNA 提取试剂盒	天根生化科技北京有限公司
琼脂糖 Biowest regular Agarose G-10	香港基因有限公司
DEPC 水	北京博奥拓达科技有限公司
维生素 A、C、E, 睾酮, FSH 等	美国 Sigma 公司

1.1.2 主要仪器

仪器	生产厂家
超净工作台	上海博讯医疗设备厂
高速冷冻离心机	Thermo 公司
可调式微量移液器	Eppendorf 公司
高压灭菌锅	韩国 DAIHAN LABTECH CO.LTD.
PCR 仪	BIO-RAD DNA Engine
超低温冰箱	Thermo 公司
恒温水浴锅	天津泰斯特仪器有限公司
电泳仪、水平电泳槽	BIO-RAD
恒温鼓风干燥箱	宁波东南仪器有限公司
超纯水系统	美国 MILLIPORE Synergy R
HQ45Z 恒温摇床	中国科学院武汉科学仪器厂
细胞培养箱	Thermo
不锈钢细胞筛 100 目、150 目	北京索莱宝科技有限公司
实时定量 PCR 仪 Agilent Mx3000P q-PCR	美国 Agilent
飞鸽台式离心机 TDL-60B	上海安亭科学仪器厂

1.2 试验材料

采集新疆石河子市牛羊定点屠宰场中湖羊的睾丸组织以备用。

1.3 siRNA 表达载体的选择

本试验选用来自湖羊血清提取的外泌体作为载体, 外泌体为纳米级的脂质双层结构的囊泡, 直径范围在 30-140nm 之间, 由于外泌体具有天然、稳定的特性, 生物相容性好, 免疫原性低, 而且没有病毒载体所具有的毒性, 可以作为蛋白质、核酸、小分子药物等的载体来进行传递。

1.4 siRNA 序列的设计

实验室团队已成功克隆获得绵羊 *Zfy* 基因的 mRNA 序列, 根据其初步筛选出了针对湖羊 *Zfy* 基因的 siRNA 序列。siRNA 设计原则: (1) G/C 相比于 A/U 更加稳定, 反义链的 5' 端是解链的开端, 所以反义链 5' 端应该选 A/U 以便解旋, 正义链的 5' 端选择 G/C; (2) 高效 siRNA 的正义链 15bp 和 19bp 之间至少有超过 3 个 A/U^[51], G/C 含量应在 30%~52%, 尽量接近 50%^[52]; (3) siRNA 目的位置的二级结构预测可将 siRNA 的效率提高; (4) 靶基因的序列要与其他基因

序列没有同源性。按照 siRNA 片段的设计原则, 利用网络在线设计 siRNA 干扰片段, 并经过 BLAST 比对特异性, 避免干扰片段对湖羊睾丸 ZFX 基因及其他基因同源区段的影响, 最终经过筛选, 选取其中五条序列, 分别为 A、B、C、D、E, 将其送至上海生物工程技术服务有限公司进行人工合成, 并对合成好的序列进行纯化。

1.5 双链 siRNA 的合成

将由生物公司合成的 siRNA 固体粉末瞬时离心 10 秒, 然后用 ddH₂O 稀释至 10mol/L, 用移液枪轻轻吹打混匀, 按序列号分组别分别取正义链、反义链 10 μ L, 1: 1 混合均匀后用 PCR 仪进行合链反应, 反应体系为 20 μ L, 程序为: 95 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 2 min、37 $^{\circ}$ C 2 min、25 $^{\circ}$ C 2 min。

1.6 siRNA 重组表达载体的构建

1.6.1 外泌体的提取纯化

无菌采湖羊血样, 室温静置 2 h, 3000 r/min 转速离心进行 5 分钟, 分离血清, 分装 100 μ L/PCR 管中, 用试剂盒进行外泌体的提取提纯。

1.6.2 外泌体透射电镜观察

将外泌体溶液滴在 100 目的载样铜网上, 室温条件下静置 1 分钟, 然后用磷酸盐溶液对其负染 1 分钟, 用滤纸从边缘小心吸走多余液体, 将铜网放到透射电镜下对外泌体形态进行观察。

1.6.3 外泌体的载药

由于外泌体直径在 30—140nm 之间, 且自身含有基因片段, 故不宜搭载较大的基因药物, 本试验选择片段较小的 siRNA 来进行, 将五组 siRNA 分别合链后, 外泌体溶液与 siRNA 溶液 2 μ L: 1 μ L 混合均匀, 采取电穿孔的方式进行载药, 分别标号为 A、B、C、D、E。电击杯在使用前用清水冲洗, 放于超净工作台中紫外风干, 然后放于 75 %酒精中浸泡过夜, 第二天取出在超净工作台中再次风干, 风干后用移液枪吸取超纯水反复吹打电击杯 10 次以上, 继续紫外风干, 以备使用。电穿孔参数: 2500 V、5 ms。

1.7 细胞水平试验

1.7.1 溶液的配制

(1) 所有玻璃器械消毒灭菌。配制 PBS 并分装。

(2) 120 mL PBS 分装于培养瓶中; 另 130 mL PBS 中添加双抗 1.3 mL 混合均匀后分装保存。

(3) 180 mL DMEM 中添加双抗 1.8 mL, 混合均匀后保存。

(4) PBS 200 mL 与胶原酶 IV 200 mg 混合均匀, 并加入 DNAs 4 mg, 贴标签为溶酶液 A。

(5) PBS 200 mL、透明质酸酶 300 mg、胰蛋白酶 0.5 mg 以及双抗 3 mL 混合均匀, 贴标签为溶酶液 B。

(6) 终止液: DMEM 180 mL 中添加 20 mL 胎牛血清和双抗 2 mL。

(7) depc 水和蒸馏水 1: 1000 混匀均匀以备用(蒸馏水要经过高压灭菌)。

(8) 含血清培养液: 取 DMEM 培养基 240 mL, 向其中添加胎牛血清 45 mL、转铁蛋白 3 mL、胰岛素 3 mL、300 μ L 丙酮酸、视黄酸 300 μ L、维生素 A、C 各 300 μ L、维生素 E 3 mL、FSH3 mL、睾酮 300 μ L。轻轻晃动培养瓶使营养成分充分混合, 均匀分成两份并分装保存, 其中一份培养液中另添加 1.5 mL 双抗。

(9) 不含血清培养液: 营养成分同(8)相同, 但其中不添加胎牛血清。

1.7.2 培养湖羊睾丸生精细胞

生精细胞和支持细胞共培养体系:

(1) 用 75%乙醇消毒睾丸组织, 滤纸吸干水分放于培养皿中。从中间剖开暴露睾丸实质, 剪两块组织分别放于两个新培养皿中, 剪碎至糊状, 每个培养皿中分别添加 24 mL PBS (含双抗), 均匀分装于离心管中, 离心机 1500 r/min 离心 10 min。弃去上清液。

(2) 添加溶酶液 A 8 mL, 用移液枪反复吹打使底部组织均匀悬浮, 在恒温培养箱中进行孵育, 期间每 5 min 上下颠倒混匀一次, 共孵育 20 分钟, 孵育条件为 37 $^{\circ}$ C, 二氧化碳浓度设置为 5%, 湿度调至 95%, 下孵育条件同。

(3) 离心机 1500 r/min 离心 10 min, 弃去上清, 添加 DMEM 培养基 4 mL, 用移液枪进行吹打混匀, 而后用同样的转速时间再次离心, 弃去上清。

(4) 重复③步骤一次, 弃上清。

(5) 添加溶酶液 B 6mL, 用移液枪混合均匀, 恒温条件下孵育 20 min, 每 5 分钟颠倒混匀 1 次。离心机 1500 r/min 10 分钟, 弃掉上清。

(6) 添加终止液 8 mL, 用移液枪吹打均匀。将经过消化的细胞悬液用 100 目以及 150 目的细胞筛过滤至大培养皿中。在显微镜下进行观察。

(7) 用移液枪吹打匀后吸入离心管中, 离心机 1500 r/min 离心 10 分钟, 去除上清液。添加 DMEM 培养基 4 mL 并轻轻吹打, 混合均匀, 用离心机 1500r/min 离心 10 分钟去掉上清液。

(8) 添加培养液(含双抗) 10 mL, 用移液枪吹打均匀, 分别等量、均匀分装于六孔板中, 封口。于 37 $^{\circ}$ C 条件下进行恒温培养, 二氧化碳的浓度设为 5%, 湿度调至 95%。

1.7.3 细胞水平的干扰效果检测

细胞在恒温培养箱中培养 24 小时后, 换液并加入无血清培养基饥饿处理半小时, 然后向其中加入外泌体干扰载体, 六孔板每孔中加入 10 μ L。6 小时后再换液, 培养 48 小时之后提取细胞总 RNA。

(1) 总 RNA 的提取

①将细胞悬液从六孔板转至离心管中, 4 $^{\circ}$ C 离心机 12000 r/min 离心 5 分钟, 吸掉上清, 放在冰盒中。分别将 5RZ 裂解液按照每孔 800 μ L 的剂量均匀加到六孔板中, 用移液器吹轻轻打使细胞悬浮, 盖上盖子摇晃均匀, 冰浴静置 10 分钟

至充分裂解。

②将六孔板中的液体转移到对应的离心管中吹打均匀，加入 1200 μL 的冰冻氯仿，用胶条封口后剧烈震荡 15 s，然后冰浴静置 5 min。离心机 4 $^{\circ}\text{C}$ 、2000 r/min 离心 10 分钟，溶液萃取分为三层，其中最上层为无色水相，将其转移入新的离心管中，并缓慢添加 1/2 体积的无水乙醇，涡旋震荡混匀。将所得的沉淀和溶液一起转入吸附柱 CR3 中，离心机 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12000 r/min 离心 30 秒，多次过柱。

③倒掉液体，向 CR3 吸附柱中加入 500 μL 去蛋白液 RD（预先加入无水乙醇），离心机 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12000 r/min 离心 30 秒，然后倒掉液体，放入管中。向 CR3 吸附柱中加入 700 μL 的 RW（确保加入无水乙醇），室温条件下静置 2 min，离心机 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12000 r/min 离心 30 秒，倒掉液体。重复一遍以上加入 RW 和其后的步骤。

④将吸附柱 CR3 放入 2 ml 的收集管中，离心机 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12000 r/min 进行离心 2 分钟，倒掉液体，晾干 30 min。取 1.5 mL 的 EP 管，加 CR3 吸附柱，加 60 μL 的 RNase-Free ddH₂O，室温条件下静置 2 分钟，离心机 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12000r/min 离心 2 分钟。用核酸浓度测定仪检测 RNA 的浓度和纯度，并琼脂糖凝胶电泳。分装并冻存于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中。

(2) 反转录合成 cDNA

用试剂盒法将提取的总 RNA 进行反转录。体系按照总 RNA 1 μL 、浓度为 1000 n g/ μL 来进行。反转录完成后，分装并在-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中冻存。

(3) qRT-PCR 检测 mRNA 的表达水平

①在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下融化冻存的 DNA，融化后添加双蒸水 40 μL 进行稀释，用移液枪吹打均匀，同时融化 SYBR 试剂盒中的试剂以及引物。

②加样至 96 孔样板中。

③PCR 仪预热 30 分钟。加样后离心 10 s 将样品混匀。按照次序将 PCR 管摆放入 PCR 仪中。

④关闭 PCR 仪盖，选定程序后进行反应。

1.8 数据分析

以 ACTB(β -Actin)作为内参基因，RT-PCR 数值采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算生精细胞 Zfy 基因 mRNA 相对表达量，分析干扰载体对生精细胞的 mRNA 表达量影响，统计对比试验组和对照组的差异，采用 SPSS24.0 软件单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 siRNA 序列设计

利用网络在线设计最终设计筛选出五条 siRNA 序列，如表 1 所示。

表 1. siRNA 序列

序列名称	序列 (5'-3')
siRNA A	GATGTTATTGATGAATGTTG
siRNA B	GAAGTCATCACGGTGTATA
siRNA C	GAAGTTTATATGGTAGTGA
siRNA D	GCATAGTAAAAAATGTCTT
SiRNA E	TGTCTTTCAAGTGTGAGAT

2.2 外泌体透射电镜观察结果

外泌体通过透射电镜观察如图 2、图 3 所示，在电镜下外泌体呈圆形或椭圆形，直径多分布于 70—120nm 之间。

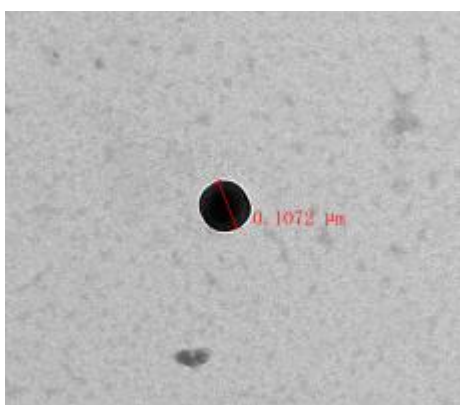


图 2. 外泌体透射电镜观察（单个）

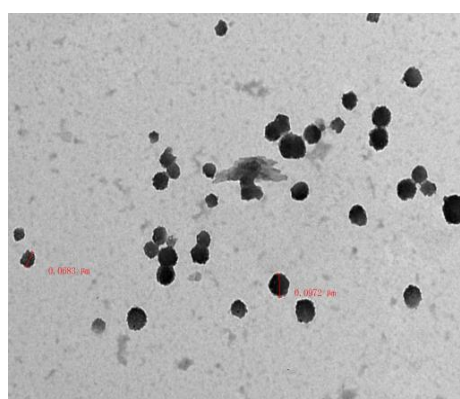


图 3. 外泌体透射电镜观察（多个）

2.3 Zfy 基因 mRNA 表达水平检测结果

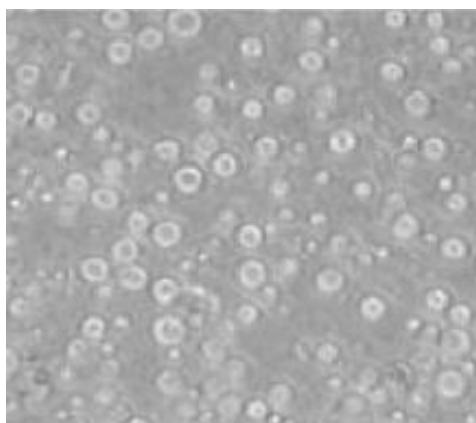


图 4. 分离得到的生精细胞

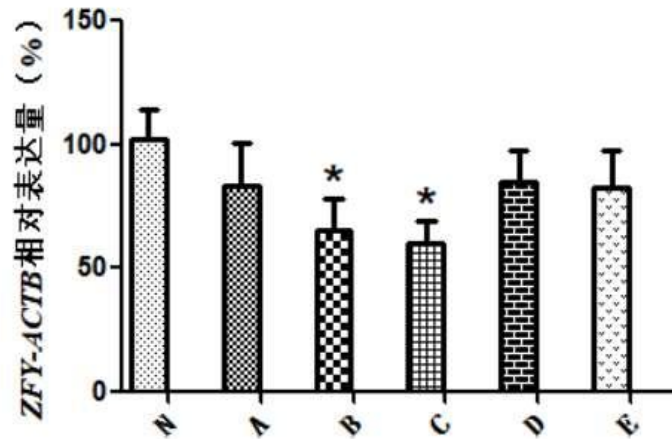


图 5. Zfy 基因 mRNA 相对表达量差异统计图

分离培养的生精细胞如图 4，外泌体干扰载体转染细胞的 *Zfy* 基因 mRNA 表达水平通过 q-PCR 检测并用相关分析软件分析，检测结果如图 5，结果显示 A、B、C、D、E 组的外泌体干扰载体与对照组相比，细胞中 *Zfy* 基因 mRNA 的相对表达量分别降低了 $18.6 \pm 17.63\%$ ，差异不显著($P > 0.05$)； $29.4 \pm 10.14\%$ 差异显著($P < 0.05$)； $32.6 \pm 7.47\%$ ，差异显著($P < 0.05$)； $16.9 \pm 12.36\%$ ，差异不显著($P > 0.05$)； $19.1 \pm 13.15\%$ ，差异不显著($P > 0.05$)。

3.讨论

目前利用 RNAi 技术对 *Zfy* 基因进行沉默，多选用慢病毒载体，且在不同动物物体上已取得了比较稳定的干扰效果，细胞水平试验也均呈现很好的结果。前期实验团队已进行了许多试验，将筛选出的序列构建载体，在细胞水平进行检测，观察 mRNA 表达情况，取得了较好的结果。刘帅兵^[53]构建了针对绵羊 *Zfy* 基因的 5 个 shRNA 干扰载体，生精细胞培养 24 小时后，用干扰载体进行转染，待 36-48 小时后用试剂盒提取细胞总 RNA，并反转录为 cDNA，检测其 mRNA 的表达水平。筛选出了 1 个干扰效果好的 shRNA 重组质粒表达载体，用其转染细胞，可使细胞 *Zfy* 表达水平下降 54%，取得了满意的效果。赞哈尔^[54]等人构建了三个针对于绵羊 *Zfy* 基因的干扰载体，有两组的细胞水平试验使 *Zfy* 基因 mRNA 的相对表达量显著性地下降，分别为 54%和 26%。秦炳燕^[55]构建了 2 个针对猪 *Zfy* 基因的 shRNA 重组质粒载体，将其对猪的生精细胞进行转染，提取总 RNA 并反转录，检测 *Zfy* 基因的 mRNA 的表达水平，结果显示两种载体分别对 *Zfy* 基因的抑制率分别为 33 %和 89 % ($P < 0.05$)，均达到了显著水平。马军德^[56]设计构建了两种针对于小鼠 *Zfy* 基因的载体，进行细胞试验探究其对 *Zfy* 基因 mRNA 表达水平的影响，结果两种载体转染的细胞 *Zfy* 基因的 mRNA 表达水平都低于两个对照组，且显著水平达到了极显著。本实验中构建的外泌体载体同样使湖羊

Zfy 基因 mRNA 表达水平下降, 其中 B 和 C 达到了显著水平, 最高下降水平达到 32.6%, 结果与其他实验相符合, 说明外泌体可作为 siRNA 的载体来进行 RNA 干扰。

4.小结

1. 构建出 5 个 Zfy 基因外泌体干扰载体;
2. 细胞水平筛选出效果最佳的外泌体干扰载体 C, 抑制率为 32.6%, 对 Zfy 基因 mRNA 的表达水平造成了显著性地下降, 用于体内试验。

试验二 湖羊体内干扰试验

湖羊是我国特有的优种羔皮用、肉用兼用的绵羊品种，同时也其优异的繁殖性能也闻名世界，其平均产羔率可达到 220%，湖羊性成熟较其他种绵羊早，母羊 7 月龄即可进行初配，公羊则为 8 月龄，终年发情，且多产多羔，运用性别控制技术促进湖羊多产母羊羔，对于畜牧业和经济发展具有很大生产意义，多产母羊，扩大基础母羊群体数量，再与其他性状优良但繁殖率较低的绵羊品种进行杂交，可以提高该绵羊品种的繁殖率，同时也可获得大量性状优良的后代绵羊，充分发挥湖羊的繁殖优势。本试验拟用序列 C 构建的外泌体干扰载体及 pLL3.7-C 干扰载体对湖羊公羊进行睾丸注射，对其 *Zfy* 基因进行干扰，影响精子生成，统计分析配母羊产羔后代的性别比例，探究利用外泌体干扰载体是否对湖羊子代性别比例具有干扰作用，能否进一步提高湖羊后代母羔比例。

1. 材料与方方法

1.1 试验材料

选择前期试验干扰效果最佳的序列 C 作为体内试验的干扰片段，构建外泌体干扰载体与 pLL3.7-C 干扰载体，试验羊全部来自新疆米泉皇牛养殖场，随机选取 1.5 岁龄、系谱资料完整且繁殖性能良好的湖羊公羊 6 只，其中 3 只注射外泌体干扰载体作为试验组，另外 3 只注射 pLL3.7-C 干扰载体做对照，与配湖羊母羊共 138 只，均为经产母羊，试验绵羊均健康、成年、拥有良好的繁殖性能。

1.2 试验方法

选取干扰效果最好的序列 C，将外泌体干扰载体及 pLL3.7-C 干扰载体稀释至 3 mg/针并添加双抗。

(1) 保定公羊，用碘酊和酒精对睾丸局部消毒。

(2) 选择 10、6 号套针，预先高压灭菌，沿睾丸纵轴方向向睾丸网进针，退针时进行注射，注意消毒清洁。

(3) 每隔 10 天注射一次，共进行 3 次。

(4) 挑选繁殖性能良好、经产、发情母羊分别与公羊合群，自然交配。记录睾丸注射日期、与配母羊耳号等信息。将妊娠母羊及时转群，做好饲养管理，母羊饲料营养水平保持一致。

(5) 待母羊产羔后，记录羔羊性别、初生重数据。

2. 结果与分析

数据采用 SPSS 24.0 统计软件进行分析。其中性别比例用卡方 (X^2) 检验，初生重用独立样本 t 检验。

2.1 后代性别比例

表 2. 后代羔羊性别比例表

组别	公羔数/只	母羔数/只	母羔率/%
对照组	42	92	68.6 (n = 134)
试验组	53	69	56.6 (n = 122) *

注: $P=0.045$ 。与对照组相比, *表示差异显著($P<0.05$), **表示差异极显著($P<0.01$)。

实验数据采用 SPSS 24.0 统计软件卡方 (X^2) 检验进行分析, 对照组的后代母羔率为 68.6%, 试验组为 56.6%, 试验组母羔率低于对照组, 且差异达到显著水平 ($P<0.05$)。

2.2 后代初生重

表 3. 后代羔羊平均初生重

组别	公羔平均初生重/kg	母羔平均初生重/kg
对照组	3.00±1.174	2.81±1.247
试验组	3.01±1.021	2.81±1.153

实验数据采取独立样本 t 检验进行分析, 结果显示, 试验组的公羔、母羔分别与对照组的公羔、母羔平均初生重差异不显著 ($P>0.05$), 表明外泌体作为干扰片段载体进行注射, 对后代胚胎发育没有产生显著影响。

3. 讨论

迄今为止, 睾丸注射法已被广泛使用, 在医学临床上多被应用治疗男性生殖疾病, 在动物方面, 已成功利用睾丸注射构建了隐睾症小鼠等模型^[57-59]。技术已稳定成熟, 随着进一步研究睾丸注射方法, 发现将其与 RNAi 等打靶技术、基因修饰技术联合应用是可行的, 给靶基因的定点整合和准确表达提供了一条有效的途径, 若能克服睾丸注射对生物体的损伤和效果不稳定的缺点, 睾丸注射将可用于批量生产转基因动物。

本试验试验组公羊每 10 天进行睾丸注射 1 次, 连续进行 3 次, 对照组同时注射空白载体, 在注射和休养期间加强对公羊的饲养管理, 补充饲喂精料, 并添加鸡蛋和胡萝卜, 使其尽快恢复。后代羔羊的初生重均无显著差异, 与赞哈尔·波拉提^[56]等人的研究结果相符合, 说明利用外泌体对 siRNA 包装后用睾丸注射进行试验并未对后代羔羊产生不良影响。

席继峰^[60]用 pLL3.7-A、pLL3.7-B 干扰载体进行湖羊的体内干扰试验, 试验结果分析后代羔羊母羔率分别是 64.7%、44.4%, 均达到了差异显著, 对湖羊精子的产生发生干扰, 人为改变了其后代的性别比例。

袁立岗^[5]等人利用了生物技术方法设计试验, 利用 Zfy 干扰基因多次处理荷斯坦牛后, 采集实验牛的精液制作为性控冻精, 探究能否成功地控制后代犊牛性别, 有效提高母犊率, 试验结果显示母犊率分别达到 76.9%、71.6%。

李超程^[61]针对马鹿 *Zfy* 基因, 以 PGenesil1.3 为载体构建 shRNA 重组载体, 实验结果显示重组质粒有效地提高了雌性小马鹿的数量比。

羔羊的初生重一定程度反应了羊的健康情况, 和断奶体重呈正相关关系, 被视为选种的重要指标, 且其可反映其母亲妊娠后期的饲养水平, 也可评判母羊的泌乳能力, 故而测定羔羊初生重十分重要, 本试验对产出后代进行了初生重的测量, 均与对照组差异不显著, 说明利用外泌体作为干扰片段的载体对试验组羔羊的健康未产生不良影响, 用外泌体做体内试验切实可行。以上各试验均为设计针对 X 或 Y 型精子性别决定相关基因的干扰序列, 用 RNAi 技术对 X 或 Y 精子进行干扰沉默, 增加另一种精子与卵子结合的几率, 从而使动物产出更多期望性别的后代, 达到性别控制的目的。以上试验结果都表明利用 RNA 干扰技术, 通过对 *Zfy* 基因进行干扰来改变后代性别比例是切实可行的。本试验选用外泌体作为干扰片段的载体, 进行体内干扰试验, 试验组结果显示后代性别的偏移率为 56.6%, 对照组为 68.6%, 且两组母羔率差异达到了显著水平, 对照组前期实验团队已多次使用, 干扰作用良好且效果稳定, 但用外泌体包装干扰片段后反而降低了对后代性别比例的干扰效果, 相比于对照组的母羔率 68.6%, 试验组母羔率有所下降, 没有取得预期增加后代母羔比例的结果, 分析其原因有两点: 一、外泌体本身不能进行复制扩繁, 且利用外泌体对干扰片段进行包装, 其包封率有限, 柯欢^[62]从小鼠树突状细胞(DC2.4)中提取外泌体并对小分子药物盐酸阿霉素进行搭载, 试验测得其载药率为 19.24%。本试验利用外泌体对干扰片段进行包装, 包封效果不尽人意, 且外泌体不能进行拷贝复制, 导致睾丸注射时干扰片段总量较少, 对沉默 Y 型精子的影响降低, 最终使后代性别比例改变不明显。二、由于试验羊场条件所限制, 外泌体干扰载体在第一次注射后由羊场保存在 4℃ 冰箱, 之后技术人员反映冰箱出现过问题, 本次试验结果母羔率略有增加但差异不显著, 与外泌体干扰载体保存不当有关。

4. 小结

1. 通过睾丸注射外泌体干扰载体干扰后代羔羊性别比例, 母羔率为 56.6%, 对照组 pLL3.7-C 干扰载体母羔率 68.6%, 试验组干扰效果显著低于对照组 ($P < 0.05$), 没有取得预期提高后代母羔率的效果。

2. 试验组与对照组公羔、母羔的初生重差异不显著 ($P > 0.05$), 提示用外泌体作载体不会对湖羊健康造成不利影响。

第三章 结论

本实验成功构建针对湖羊 *Zfy* 基因的外泌体干扰载体，并在细胞水平对 *Zfy* 基因的 mRNA 的表达量产生干扰效果，其中 B 组、C 组效果达到了差异显著水平。在动物体内干扰试验中，试验组后代母羔率虽有所提升，但其干扰效果显著低于对照组，并未取得预期提高后代母羔率的效果。

参考文献

- [1] 廖勤丰,何航,陈亚强,等.哺乳动物性别决定相关基因研究进展[J].家畜生态学报,2019,40(07):9-12
- [2] 杨灼雄,杨旭,贺子恒.常见性别控制技术及其在畜牧生产中的应用[J].云南畜牧兽医,2018(03):32-35.
- [3] Jacobs PA, Strong JA. A case of human intersexuality having a possible possible XXY sex — determining mechanism [J] . Nature,1959,183 (4657) : 302-303.
- [4] Page DC. Is ZFY the sex-determining gene on the human Y chromosome [J] . Philos Trans R Soc Lond B Biol Sc, 1988, 322(1208) : 155 -157.
- [5] 袁立岗,席继峰,柳炜,徐建平.Zfy 干扰基因对荷斯坦牛性别控制的效果[J].中国奶牛,2019(03):18-21.
- [6] 张永生,席继峰,王香祖,等.Zfy 基因与哺乳类动物性别控制研究进展[J].畜牧与兽医,2016,48(12):105-108.
- [7] Kashimada K, Koopman P. Sry: the master switch in mammalian sex determination [J]. Development, 2010, 137(23): 3921-3930.
- [8] 邱海芳,刘炳义,刘榜,等.性别控制技术在家畜育种中的应用[J].中国畜牧兽医,2010,37(07):113-115.
- [9] 田志华.家畜性别鉴定与性别控制技术在猪育种中的应用[J].畜牧兽医杂志,2000(02):23-25.
- [10] 魏红芳,秦粉菊,徐照学,等.家畜性别控制与胚胎性别鉴定技术在畜牧业中的应用[J].河南农业科学,2001(01):27-29.
- [11] 郭海燕,张昊,李拥军,等.性别控制技术及其在家畜生产中的应用[J].安徽农业科学,2016,44(25):116-118.
- [12] Dominguez José Henrique E, Costa Deiler S, et al. Pregnancy rate of Nelore females inseminated with male-sexed semen.[J]. Animal reproduction science, 2011, 129(3-4).
- [13] 杨海,胡建宏,李青旺.哺乳动物性别决定与性别控制研究进展[J].广东农业科学,2012,39(18):144-147.
- [14] 吴志焕,付秀芬,曾宪垠.RNA 干扰及其在动物繁殖中的应用[J].黑龙江动物繁殖,2008(04):9-12.
- [15] 姚燕丹,宋尔卫.RNA 干扰体内导入技术研究进展[J].生命科学,2010,22(07):616-622.
- [16] 张海涛,李郑武,王莹,等.RNA 干扰技术给药途径的研究进展[J].重庆医学,2011,40(05):495-497.
- [17] 吴志焕,付秀芬,曾宪垠.RNA 干扰及其在动物繁殖中的应用[J].黑龙江动物繁殖,2008(04):9-12.
- [18] 栗挺,刘爱玲,陈信波.RNA 干扰载体构建方法的研究进展[J].湖南农业科学,2011(19):1-4.
- [19] Guo Qigao, Liu Qing, Smith Neil A, et al. RNA Silencing in Plants: Mechanisms, Technologies and Applications in Horticultural Crops. [J]. Current genomics, 2016, 17(6).
- [20] 王春蕾,赵博,丛斌.RNA 干扰技术的应用现状及研究进展[J].农业科技与装备,2009(03):110-111.
- [21] 朱乃甫,和立挺,邓凯.RNA 干扰技术及其应用前景[J].生物技术世界,2013(05):4-5.
- [22] 袁茵,王一飞.RNAi 技术的医疗应用潜力[J].国外医学(分子生物学分册),2003(06):378-381.
- [23] Wianny F, Goetz ZM. Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development [J]. Nat Cell Biol, 2000, 2: 70-75.
- [24] Xu Z, Williams C J, Kopf G S, et al . Maturation associated increase in IP3 receptor type 1: role in conferring increased IP3 sensitivity and Ca²⁺ oscillatory behavior in mouse eggs [J]. Dev

- Biol , 2003, 254(2): 163-171.
- [25] Shoji M, Chuma S, Yoshida K, et al. RNA interference during spermatogenesis in mice [J]. *Developmental Biology*, 2005, 282:524-5340.
- [26] Williams C J, Schultz R M. Transgenic RNAi : a tool to study testis specific genes [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2006, 247(2):1-3.
- [27] Bettencourt-Dias M, Rodrigues-Martins A, Carpenter L, et al . SAK-LK4 is required for centriole duplication and flagella development [J]. *Curr Biol*, 2005, 15(24):2 199-2 207.
- [28] Rao M K, Pham J, Imam J S, et al . Tissue specific RNAi reveals that WT1 expression in nurse cells controls germ cell survival and spermatogenesis [J]. *Genes Dev*, 2006, 20(2):147-152.5
- [29] 向红平, 周红, 韩勇. 载带蛋白质药物的新型递送系统——外泌体[J]. *医药导报*, 2018, 37(10):1155-1160.
- [30] 陈慧芳, 杨镁楹, 吴志胜, 等. 外泌体 miRNA 在配子发育和受精中的调控作用[J/OL]. *中国畜牧杂志*:1-13[2020-06-25]. <https://doi.org/10.19556/j.0258-7033.20200304-01>.
- [31] 赵濛, 刘志红, 李金泉. 外泌体组成特征及其作为细胞通讯和分子标记的生物学作用[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2016, 32(06):612-619.
- [32] 杨东丽, 杨琼, 罗嘉, 等. 外泌体参与骨骼肌机能调控研究进展[J]. *动物医学进展*, 2018, 39(1):103-108.
- [33] 吴石磊, 刘勇, 邵增务, 等. 骨组织细胞外泌体对骨代谢作用的研究现状[J]. *中华老年骨科与康复电子杂志*, 2018, 4(05):308-311.
- [34] 徐天星, 徐望明, 张婕. 外泌体与囊胚发育及种植关系研究新进展[J]. *生殖医学杂志*, 2020, 29(06):829-833.
- [35] 华仁武, 雷明刚. 外泌体调控哺乳动物妊娠作用的研究进展[J/OL]. *中国畜牧杂志*:1-10[2020-06-26]. <https://doi.org/10.19556/j.0258-7033.20191010-03>.
- [36] 陈偲, 王建军, 汤立军. 外泌体与结核分枝杆菌相互作用的研究进展[J]. *免疫学杂志*, 2013, 29(2): 177-179.
- [37] 韩愚弟, 白云, 任静, 等. 外泌体在再生修复及抗衰老领域的研究进展[J]. *解放军医学院学报*, 2018, 39(08):734-736.
- [38] 彭梦阳, 贺花, 王献伟, 等. 外泌体的生物学功能和调控机制研究进展[J/OL]. *中国畜牧杂志*:1-11[2020-06-25]. <https://doi.org/10.19556/j.0258-7033.20200224-01>.
- [39] 秦宸媛, 胡嘉玮, 蔡梦瑶, 等. 外泌体在慢性病发生发展中的调控作用及临床辅助诊疗研究进展[J]. *中国公共卫生*:1-6.
- [40] 周昌奕, 谭磊, 丁铲. RNA 病毒利用外泌体促进病毒感染的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2017, 44(12):2988-2996.
- [41] 林慧娴, 刘春辰, 郑磊. 外泌体检测及其临床应用研究进展 [J]. *中国医学装备*, 2019, 16(07):15-19.
- [42] Sáenz-Cuesta M, Osorio-Querejeta I, Otaegui D. Extracellular vesicles in multiple sclerosis: what are they telling us?[J]. *Front Cell Neurosci*, 2014, 8: 100.
- [43] 尹刚, 刘蔡钺, 林耀发, 等. 脂肪干细胞来源外泌体对周围神经损伤后再生作用的实验研究[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2018, 32(12): 1592-1596.
- [44] 李思迪, 侯信, 亓洪昭, 等. 外泌体:为高效药物投递策略提供天然的内源性纳米载体[J]. *化学进展*, 2016, 28(Z2):353-362.
- [45] 周建芬, 柴芝兰, 谢操, 等. 外泌体作为药物递送载体的研究进展[J]. *中国医药工业杂志*, 2020, 51(04):425-433.
- [46] 张盈盈, 陈丽青, 刘璇, 等. 外泌体作为药物递送载体的研究进展[J]. *药理学*

- 报,2019,54(06):1010-1016.
- [47]黄琳,王殿冰,顾宁,等.高效装载细胞内源蛋白工程化外泌体的构建[J].生物工程学报,2019,35(08):1537-1545.
- [48]王子好,郑冉,马明君,等.外泌体作为药物载体应用及其靶向给药策略[J].中国细胞生物学学报,2017,39(08):1118-1123.
- [49]刘艳,戴鹏,朱运峰.外泌体新型药物运载系统的研究进展[J].中国药理学与毒理学杂志,2020,34(01):52-57.
- [50]解曼曼,张海涛,林文勇,等.外泌体作为药物载体的研究进展[J].中西医结合心脑血管病杂志,2019,17(22):3525-3528.
- [51]赵德根,王建校,刘旭,等.小干扰 RNA 的研究进展[J].现代生物医学进展,2014,14(04):792-794.
- [52] Reynolds A, Leake D, Boese Q, et al. Rational siRNA design for RNA interference[J]. Nat Biotechnol, 2004, 22 (3) :326-330
- [53]刘帅兵. 绵羊 Zfy 基因干扰载体筛选及性控效果的验证[D].石河子大学,2014.
- [54]赞哈尔·波拉提,孙丽荣,等.绵羊 Zfy 基因干扰载体构建及性控效果观察[J].石河子大学学报(自然科学版),2015,33(06):721-726.
- [55]秦炳燕,孙丽荣,张永生,等.猪 Zfy 基因干扰载体的构建及性控效果的验证[J].畜牧与兽医,2016,48(12):53-57.
- [56]马军德.小鼠 Zfy 基因 RNAi 病毒载体的构建及性控效果的观察[D].石河子大学,2013.
- [57] Dobashi Masaki, Goda Kazumasa, Maruyama Hiroki, et al. Erythropoietin gene transfer into rat testes by in vivo electroporation may reduce the risk of germ cell loss caused by cryptorchidism.[J]. Asian journal of andrology, 2005, 7(4).
- [58] Celebi C, Auvray P, Benvegnu T, et al. Transient transmission of a transgene in mouse offspring following in vivo transfection of male germ cells[J]. Mol Reprod Dev, 2002, 62(4):477-482.
- [59] Yonezawa T, Furuhashi Y, Hirabayashi K, et al. Detection of transgene in progeny at different developmental stages following testis-mediated gene transfer.[J]. Molecular reproduction and development, 2001, 60(2).
- [60]席继锋,王香祖,张永生,等.睾丸注射转基因技术研究进展[J].畜牧与兽医,2016,48(11):115-119.
- [61]李超程. 马鹿 Zfy 基因干扰载体筛选及性控效果的研究[D].石河子大学,2017
- [62]柯欢,龚涛,张志荣,孙逊.外排体载体给药系统的制备和体外性质的初步研究[J].华西药学杂志,2018,33(02):143-145.

致 谢

两年研究生生涯转瞬即逝，回顾这两年的点滴，各位老师给了我很多指导和帮助。老师们严谨的治学，优良的作风和敬业的态度，为我们树立了为人师表的典范。在此对所有的石河子大学动物科技学院的老师们表示感谢，祝你们身体健康，工作顺利！

从论文的选题、资料的收集、实验的进行到论文的撰写编排整个过程中，我得到了许多的热情帮助和中肯的建议。

首先诚挚地感谢我的导师贾斌教授，他严谨细致、一丝不苟的作风是我工作、学习中的榜样。老师从一开始的论文方向的选定，到最后的论文的完成，都非常耐心的对我进行指导。给我提供了大量资料和建议，告诉我应该注意的细节问题。

其次，非常感谢实验室各位同门的鼎力相帮，在百忙之中抽出时间帮助我搜集文献资料，设计实验方案，刚开始进行实验时对我的耐心指点，让初次独立实验的我少走了很多弯路，需要援手时鼎力相助，特别感谢师哥李超程帮助搜集整理了大量的文献给我，师哥邹声雷多次在凌晨别人安睡之时陪我去屠宰场进行采血，在我最后撰写论文时提供了大量帮助。在此，对给予我帮助的同门们表示真挚的感谢。

毕业论文的完成已经进入了尾声。从开始进入课题到论文的顺利完成，一直都离不开老师、家人、同学、朋友给我热情的帮助和支持，在这里请接受我诚挚的谢意。

作者简介

武赟，女，生于 1996 年 5 月，籍贯山西。2018 年 6 月毕业于石河子大学动物科技学院动物科学专业，获农学学士学位。2018 年 9 月起在石河子大学动物科技学院攻读畜牧硕士专业研究生学位。

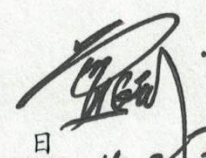
发表文章：

武赟,贾斌,邹声雷,李超程,李梦雨,张雪.外泌体介导对湖羊性别控制的影响[J].畜禽业,2020,31(08):4-5.

获奖情况：

2018年获得“二等奖学金”

石河子大学硕士研究生学位论文 导师评阅表

研究生姓名	武赞	学制	2 年制
专业	农业 (畜牧)	研究方向	动物遗传育种与繁殖
学术评语:			
<p>论文将性控与 RNAi 技术相结合, 通过体外和体内试验, 探究外泌体作为载体是否能进一步, 提高对湖羊 ZFY 基因的干扰效率, 从而达到控制性别的目的, 选题有一定创新性, 且课题结合实际, 对羊养殖生产具有指导意义, 为绵羊的性别控制及动物后遗传育种与繁殖提供新的科研思路, 也为其他家畜及特种经济动物在受精前性控提供研究模型。</p>			
指导教师签字:  年 月 日 2020. 11. 27.			