

• 技术与方法 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.15.023

TALE-TFs 构建方法的建立及优化^{*}

王媛媛¹, 苏攀柯¹, 黄爱龙², 胡接力^{2△}

(1. 河南科技大学第一附属医院检验科, 河南洛阳 471000; 2. 重庆医科大学附属第二医院
教育部感染性疾病分子生物学重点实验室, 重庆 400016)

[摘要] **目的** 在传统方案的基础上建立一种经济有效且易于操作的类转录激活效应子转录因子(TALE-TFs)的构建和功能检测方案。**方法** 采用基于 PCR 的 Golden gate 克隆法分别尝试构建类转录激活效应物(TALEs)的六聚体、五聚体、四聚体和三聚体, 比较构建结果, 选择最优效果方案进行 TALE-TFs 的构建。采用片段置换反应(FSR)构建了含有 TALE-TFs 结合片段的 RFP 质粒 pminCMV, 并与 TALE-TFs 进行共转染, 观察红色荧光验证 TALE-TFs 的转录活性。**结果** TALEs 中所含的串联重复模块越少, 获得的构建产物越多。共转染时, TALE-TFs 使得 pminCMV 成功启动表达。**结论** 该研究为不同条件下实验方案的选择提供了依据, 并利用含有 TALE-TF 结合片段和红色荧光的质粒建立了快捷直观的转录活性验证方法。

[关键词] 类转录激活效应物; 质粒构建; 转录; 转染

[中图分类号] R34

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)15-2079-05

Establishment and optimization for TALE-TFs construction^{*}

Wang Yuanyuan¹, Su Panke¹, Huang Ailong², Hu Jieli^{2△}

(1. Department of Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471003 China; 2. Key Laboratory of Molecular Biology on Infectious Diseases, Ministry of Education, Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016 China)

[Abstract] **Objective** To optimize the method of transcription activator-like effector transcription factors (TALE-TFs) construction, some improvement and adaption were made based on the traditional methods. **Methods** We first constructed the basic tandem fragments with different length, including trimer, tetramer, pentamer and hexamer by Golden Gate cloning technique and PCR, then the procedure with the highest efficacy was chosen to construct our TALE-TFs. To determine the function of the TALE-TFs, the plasmid pminCMV with the specific binding sequence of TALE-TFs was constructed by fragment substitution reaction (FSR). The transcription activating function of TALE-TFs was confirmed by the intensity of red fluorescence, after TALE-TFs, pEGFP-N1 and pminCMV plasmid were co-transfected into 293HEK cells. **Results** An optimized method for TALE-TFs construction and functional assay was established. **Conclusion** This method can potentially be widely used in fields that the expression of some constitutively expressed genes needs to be modified.

[Key words] transcription activator-like effectors; plasmid construction; transcription; transfect

类转录激活效应物(TALEs)蛋白家族是来自于植物病原体-黄单胞杆菌的天然细菌效应蛋白。它类似于真核生物的转录因子, 通过识别特异 DNA 序列来调节宿主基因的转录, 促进细菌定植。TALEs 蛋白中部包含一段由串联重复单体构成的 DNA 特异识别和结合区域, 其中每个单体含有大约 34 个氨基酸。而 TALEs 的重复部分是由数个重复单体加约含 20 个氨基酸残基的 0.5 个重复单位构成^[1]。天然形成的 TALEs 具有大约 1.5~33.5 个数量不等的单体, 虽然每个单体在序列上是高度保守的, 但是他们的第 12 和 13 位点的氨基酸却有所不同, 这两个位点被命名为重复可变双残基(RVD)。每个 RVD 中有一个简单密码来指定识别一个特定的碱基, 从而决定了 TALEs 核苷酸结合的特异性。如 NI(Asn/Ile)对应 A、NG(Asn/Gly)对应 T、HD(His/Asp)对应 C、NN(Asn/Asn)对应 G/A^[2-3]。人工定制的 TALEs 可以运用到基因组工程的多

个方面, 包含起转录修饰作用的 TALE-TFs 和基因组剪輯作用的类转录激活因子效应物核酸酶(TALEN)等^[4-7]。

人工定制 TALEs 技术作为一个全新而又有效的基因组工程策略将会成为大多数实验室所必备的技术之一, 因此本课题组针对 TALE-TFs 的构建进行尝试, 希望建立一套适合本实验室使用, 而制备手段又更为优化快捷和直观的实验方案。一般实验室构建方案多采用以初次 Golden Gate 反应生成 TALEs 六聚体为基础, 经过 2 次 Golden Gate 反应最终形成十八聚体。本实验对初次 Golden Gate 反应形成 TALEs 三聚体、四聚体、五聚体和六聚体分别进行了构建尝试, 在兼顾获取难度和识别的目的基因长短的基础上选择了五聚体进行了下一步构建。在功能测定方案上改变传统的质粒构建和定量 RT-PCR 相结合的方案, 采用联合片段置换反应(FSR)^[8](不需要进行酶切连接的克隆技术, 由本课题组在前期建立的基因

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81000732)。 作者简介: 王媛媛(1982—), 硕士, 主管检验师, 主要从事生物化学检验方面的研究。 △ 通讯作者, E-mail: hujieli1977@gmail.com。

克隆技术)构建了带有目的基因片段和红色荧光报告基因的质粒,通过共转染的方式来直接观察 TALE-TFs 的转录效率。这为本课题组下一步进行体内基因转录调节奠定了基础,并为其 他构建者提供经验和新的方案参考。

1 材料与方 法

1.1 实验材料 合成引物(生工生物工程上海有限公司),TALEs 单体模板(Addgene 提供),Herculase II fusion polymerase(购自 Agilent Technologies),BsmBI、BsaI-HF、AfeI(购自 NEW England Biolabs),T7 DNA ligase、Tag-B polymerase(购自 Enzymatics),DL2000 DNA Marker(购自宝生物大连有限公司),PlasmidSafe ATP-dependent DNase(购自 Epicentre),转染试剂 Lipofectamine™-2000(购自 Invitrogen),质粒提取试剂、质粒载体 pEGFP-N1、腺病毒 Ad-RFP(购自 Promega),转染细胞 293HEK、DH5a 感受态(重庆医科大学教育部感染性疾病分子生物学重点实验室)。

1.2 实验方 法

1.2.1 引物制备 根据实验需要本课题组制备了一系列的引物(表 1)。

1.2.2 以 TALEs 单体质粒为模板进行扩增 分别选择 TALEs 单体质粒 NI、NG、HD、NN 为模板,根据其所在串联结

构的位置,选择相应的引物,进行 PCR 扩增。引物选择方案见表 2。PCR 反应采用 100 μL 反应体系:单体模板质粒(5 μg/μL)1 μL,dNTP(100 μmol/L)1 μL,Herculase II PCR buffer(5 ×)20 μL,20 μmol/L primer mix 2 μL,Herculase II fusion polymerase 1 μL,Distilled water 补足到 100 μL。PCR 反应程序按照:95 ℃ 预变性 2 min;95 ℃ 变性 20 s,60 ℃ 退火 20 s,72 ℃ 延伸 10 s,进行 32 个循环;72 ℃ 延伸 3 min,4 ℃ 保存。PCR 产物进行电泳和胶回收,执行产物纯化后备用。

1.2.3 利用 Golden Gate 反应制备环形多聚体 采用配对引物(表 2)分别进行环形六聚体、五聚体、四聚体、三聚体的组装,多聚体构建方案,以五聚体为例见图 1A。比较结果,决定最后要选择的多聚体构建方案,对照靶识别的序列,构建识别 3 个连续序列的多聚体,每个所含重复单体数目相同。均采用 10 μL 反应体系:BsmI(10 U/μL)0.75 μL,Tango buffer(10 ×)1 μL,DTT(10 mM)1 μL,T7 Ligase(3 000 U/μL)0.25 μL,ATP(10 mM)1 μL,6 个单体按照选择个数各 1 μL,不足 10 μL 时用 Distilled water 补足。Golden Gate 反应结束后,采用 PlasmidSafe ATP-dependent DNase 消化降解非环形结构后纯化产物。降解方法见产品说明。

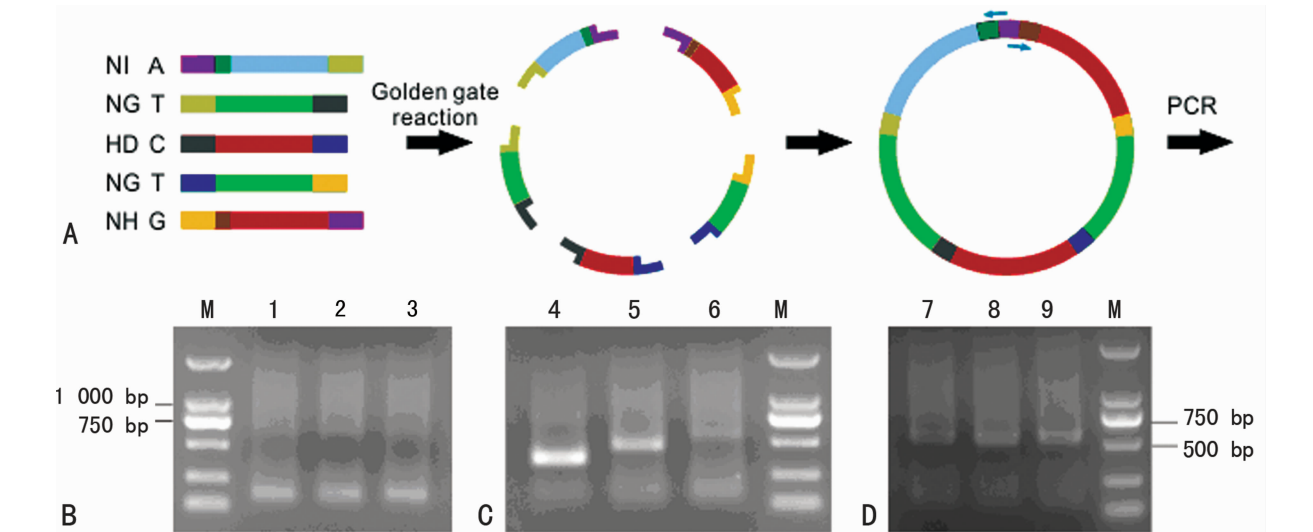
表 1 TALE-TF 构建的引物序列

引物	引物序列(5'-3')
Ex-F1	TGCGTCCGTCTCCGAACCTTAAACCGGCCAACATACCGGTCTCCTGACCCAGAGCAGGTCGTG
Ex-F2	TGCGTCCGTCTCCGAACCTTAAACCGGCCAACATACCGGTCTCGACTTACACCCGAACAAGTCGTGGCAATTGCGAGC
Ex-F3	TGCGTCCGTCTCCGAACCTTAAACCGGCCAACATACCGGTCTCGCGGCCTCACCCAGAGCAGGTCG
Ex-F4	TGCGTCCGTCTCCGAACCTTAAACCGGCCAACATACCGGTCTCGTGGGCTCACCCAGAGCAGGTCG
Ex-R1	GCTGACCGTCTCCGTTCAGTCTGTCTTTCCCTTTCCGGTCTCTAAGTCCGTGCGCTTGGCAC
Ex-R2	GCTGACCGTCTCCGTTCAGTCTGTCTTTCCCTTTCCGGTCTCAGCCGTGCGCTTGGCACAG
Ex-R3	GCTGACCGTCTCCGTTCAGTCTGTCTTTCCCTTTCCGGTCTCTCCCATGGGCCTGACATAACACAGGCAGCAACCTCTG
Ex-R4	GCTGACCGTCTCCGTTCAGTCTGTCTTTCCCTTTCCGGTCTCTGAGTCCGTGCGCTTGGCAC
In-F2	CTTGTTATGGACGAGTTGCCCGTCTCGTACGCCAGAGCAGGTCTGTGGC
In-F3	CCAAAGATTCAACCGTCTCTCGTCTCGAACCCAGAGCAGGTCTGTG
In-F4	TATTCATGCTTGGACGGACTCGTCTCGGTTGACCCAGAGCAGGTCTGTG
In-F5	GTCTTAGTGAGGAATACCGGCGTCTCGCCTGACCCAGAGCAGGTCTGTG
In-F6	TTCTTGATACCGTAGCTCGCGTCTCGGACACCAGAGCAGGTCTGTGGC
In-R1	TCTTATCGGTGCTTCGTTCTCGTCTCCCGTAAGTCCGTGCGCTTGGCAC
In-R2	CGTTTCTTTCCGGTCTGTAGCGTCTCTGGTTAGTCCGTGCGCTTGGCAC
In-R3	TGAGCCTTATGATTTCCTCGTCTCTCAACCCGTGCGCTTGGCACAG
In-R4	AGTCTGTCTTTCCCTTTCCCGTCTCTCAGGCCGTGCGCTTGGCACAG
In-R5	CCGAAGAATCGCAGATCTACGTCTCTTGTCAGTCCGTGCGCTTGGCAC
Hex-F	CTTAAACCGGCCAACATACC
Hex-R	AGTCTGTCTTTCCCTTTTCC
F RFP-N1	GGCCCGGGATCCACCGGTTCGCCACCATGGCCTCCTCCGAGGACGTC
R RFP-N1	GGCTGATTATGATCTAGAGTCGCGGTACGTTATCTAGATCCGGTG
Rsv40	AAGATACATTGATGAGTTTG
Fmin	CAGTTAATTAATACCACAAGAACACTAACTAGTACGTATGTCGAGGTAGGCGTGACGGTGGGA
Rmin	ACCTTAATTAAATGCATGGCGGTAATACGGT
F1.1 CMV	CCATTGACGCAAATGGGCGGTAG
F N14710	GATAACCGTATTACCGCCATGC

表 2 TALEs 构建的引物选择方案

site	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Hexamer	Ex-F1	In-F2	In-F3	In-F4	In-F5	In-F6	Ex-F2	In-F2	In-F3	In-F4	In-F5	In-F6	Ex-F3	In-F2	In-F3	In-F4	In-F5	In-F6
	In-R1	In-R2	In-R3	In-R4	In-R5	Ex-R1	In-R1	In-R2	In-R3	In-R4	In-R5	Ex-R2	In-R1	In-R2	In-R3	In-R4	In-R5	Ex-R4
Pentamer	Ex-F1	In-F2	In-F3	In-F4	In-F5	Ex-F2	In-F2	In-F3	In-F4	In-F5	Ex-F3	In-F2	In-F3	In-F4	In-F5	—	—	—
	In-R1	In-R2	In-R3	In-R4	Ex-R1	In-R1	In-R2	In-R3	In-R4	Ex-R2	In-R1	In-R2	In-R3	In-R4	Ex-R4	—	—	—
Tetramer	Ex-F1	In-F2	In-F3	In-F4	Ex-F2	In-F2	In-F3	In-F4	Ex-F3	In-F2	In-F3	In-F4	—	—	—	—	—	—
	In-R1	In-R2	In-R3	Ex-R1	In-R1	In-R2	In-R3	Ex-R2	In-R1	In-R2	In-R3	EX-R4	—	—	—	—	—	—
Trimer	Ex-F1	In-F2	In-F3	Ex-F2	In-F2	In-F3	Ex-F3	In-F2	In-F3	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	In-R1	In-R2	Ex-R1	In-R1	In-R2	Ex-R2	In-R1	In-R2	EX-R4	—	—	—	—	—	—	—	—	—

1~18:TALEs 中单体对应所识别碱基在靶识别片段中的位置。



1:Hexmaer1;2:Hexmaer2;3:Hexmaer3;4:Trimer;5:Tetramer;6:Pentamer;7:Pentamer1;8:Pentamer2;9:Pentamer3。

图 1 TALEs 多聚体的构建

1.2.4 第 2 次 Golden Gate 反应形成最后的 TALEs 结构并转化 用 Hex-F 和 Hex-R 为引物对构建的多聚体进行扩增,3 个多聚体扩增后的片段结合 TALE-TFs 的骨架质粒进行第 2 次 Golden Gate 反应。反应体系为:骨架质粒(100 ng/ μ L) 1 μ L,BsaI-HF(20 U/ μ L)0.75 μ L,NE Buffer 4(10 $\times$)1 μ L,BSA (10 $\times$)1 μ L,ATP(10 mM)1 μ L,T7 ligase(3 000 U/ μ L) 0.25 μ L,3 个纯化的多聚体每个 1 μ L,Distilled water 补足到 10 μ L。产物纯化后转化。

1.2.5 构建含有 TALE-TF 识别序列和报告基因的质粒 先从腺病毒 Ad-RFP 上利用引物 F RFP-N1 和 R RFP-N1 对 RFP 片段进行 PCR 扩增,将所获得的 PCR 产物利用 FSR 克隆技术替换到 pEGFP-N1 上,获得质粒 pRFP。再利用引物 Fmin 和 Rmin 对 pRFP 进行 PCR 扩增。实验在 Fmin 及 Rmin 的引物序列中加入了 TTAATTAA 的酶切位点,可使其酶切后再自连。此外在 Fmin 序列中实验还加入了靶识别序列,T ACCAC AAGAA CACTA,识别序列以 T 开头,后每个 RVD 对应 1 个碱基,共识别 15 个碱基。PCR 产物经过酶切连接后将形成 1 个含有目标靶点序列和 RFP 报告基因的质粒 pminCMV。

1.2.6 采用共转染的方式验证 TALE-TF 的转录活性 采用转染试剂 Lipofectmine2000 分别将 TALE-TFs 载体质粒、pEGFP-N1、和 pminCMV 3 个质粒和 TALE-TFs、pEGFP-N1 和 pminCMV 3 个质粒共转染进入 HEK293 细胞,利用荧光显

显微镜对自然光下细胞、绿色荧光和红色荧光进行观察,判断构建质粒 TALE-TFs 的转录活性,验证其功能。转染方法见试剂说明。

2 结 果

2.1 Golden Gate 反应制备环形多聚体 在实验开始之初,作者采用了以六聚体为基础的 TALEs 构建方案,构建完成后采用引物 Hex-F 和 Hex-R 进行扩增,得到六聚体线性结构后电泳(图 1B)。如图所示,在 750 bp 左右的位置存在较弱的六聚体条带,显示其获取效率较低。为了提高多聚体获取效率,作者推测构建更短的多聚体应该更容易。为此,分别构建了三聚体、四聚体和五聚体,同样引物 PCR 得到电泳条带分别在小于 500 bp、500 bp 左右和 750~500 bp 之间(图 1C)。这些结果显示,与之前的推测相符,片段越小多聚体的获得效率就越高,所获得的电泳条带的浓度越大。结合靶识别片段的长度及序列,本研究最终选择构建以五聚体为基础的 TALEs 构建方案。3 个五聚体经过 2 次 Golden Gate 反应,得到 TALEs 最终的十五聚体结构。3 个五聚体均采用引物 Hex-F 和 Hex-R 进行 PCR,电泳结果均为 750~500 bp(图 1D)。

2.2 pminCMV 质粒构建结果 第 1 步,对 pRFP 进行构建,构建程序见图 2A。首先从 Ad-RFP 中扩增出 RFP 片段,电泳(图 2B),所得电泳条带在约 800 bp 处,与预期相符。再采用片段置换反应将该 RFP 片段克隆到 pEGFP-N1 中,获得 pRFP 质粒。转化扩增后提取质粒,利用引物 F1.1CMV 和 R RFP-

N1 做 PCR 挑选出阳性克隆(图 2B),结果显示筛选的 5 个克隆中有 4 个 750~500 bp 条带,为阳性克隆,测序结果证明载体构建正确。第 2 步,采用引物 Fmin 及 Rmin 对 pRFP 质粒进行扩增后,酶切 PCR 扩增片段,然后自身连接环化,即构建为 pminCMV 质粒(图 2C)。pRFP 质粒的 PCR 产物电泳结果为大小约 4 500 bp 的片段(图 2D 左),生成的 pminCMV 质粒采用引物 F N14710 和 R SV40 进行 PCR 扩增进行克隆筛选。PCR 产物电泳,得到 1 200 bp 附近条带的为阳性克隆(图 2D 右)。

2.3 TALE-TF 的转录活性验证 将 TALE-TFs 骨架质粒、pEGFP-N1 和 pminCMV 共转染至 HEK293 细胞作为阴性对照(图 3)。转染后在荧光显微镜下可见大量绿色荧光,红色荧光未见。结果提示,TALE-TFs 骨架质粒不能将 pminCMV 激活使其发出红色荧光。将目标 TALE-TFs、pEGFP-N1 和 pminCMV 共转染至 HEK293 细胞后发现,红色荧光明显可见(图 3)。由此可见,作者构建的 TALE-TFs 质粒具有转录活性,可使含有目的识别片段的 pminCMV 成功表达出红色荧光。

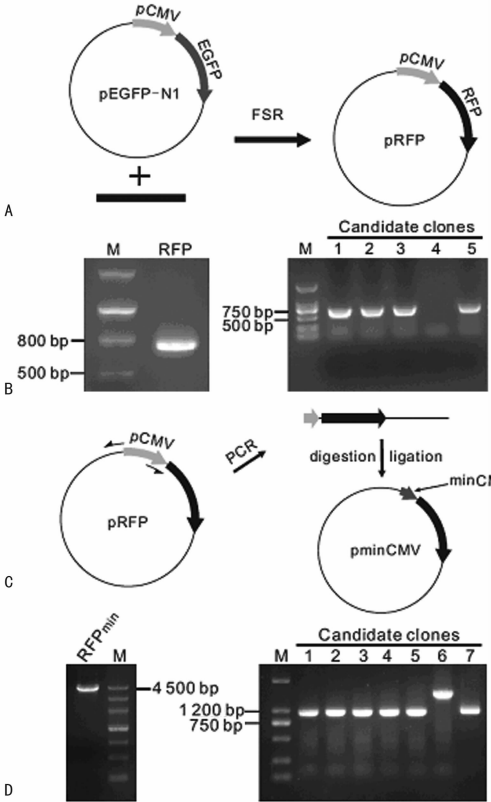


图 2 质粒 pminCMV 的构建

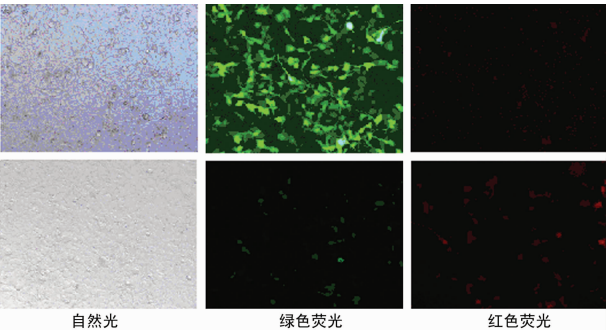


图 3 TALEs-TF 在 HEK293 细胞中的活性

3 讨论

在 TALEs 与 DNA 的特异性识别的分子密码被破译之后,人们便开始试图将其作为特定基因位点的靶向修饰工具。为了确保 TALEs 识别的特异性,它所识别的靶基因片段应至少大于 10 bp,TALEs 结构中应至少含有 9.5 个重复单元。所以说,TALEs 结构中重复序列单元的构建,对于这一靶向修饰技术的建立具有重大意义,而这一环节又恰恰成为了这一技术的难点。因而,从 TALEs 技术发展至今的 3、4 年时间里,国外出现了大量关于此项技术的研发和改进的报道。

目前人工构建 TALEs 技术主要包含有较为昂贵的全序列人工合成^[9], Golden Gate 克隆法^[4,10], 连续克隆组合法^[11-12]、利用基因固相合成的高通量技术^[13]和长粘末端的 LIC(ligation-independent cloning)^[14]组装方法等。其中最常用的为 Golden Gate 克隆法,它是利用了 IIS 型限制性核酸内切酶^[4,7,15-18]识别位点与切割位点分离的特点,通过相同的 IIS 型限制性核酸内切酶设计不同黏性末端的方式,实现了一次性酶切连接反应之后片段按照指定次序进行连接,构建出本研究所需要的碱基识别顺序。本实验就是在以基于 PCR 的 Golden Gate 克隆法为基础,对这一方法进行尝试和适当改进,建立一套适合于本课题需要和尽可能方便简洁的具体实验方案。

在该实验进行的初始阶段,作者选择常用的以首次 Golden Gate 反应构建 TALEs 六聚体的实验方案。六聚体纯化电泳后发现电泳条带很弱,重回收效果不佳(图 1B)。于是作者对五聚体、四聚体、三聚体分别进行了构建尝试后发现形成的多聚体结构越小它的获得效率越高(图 1C)。综合考虑 DNA 识别序列的长度,本研究最终选择了构建五聚体。鉴定 TALE-TFs 的转录效率是考察本实验成功与否的关键。据研究报道,TALE-TFs 的转录效率的检测方案常采用将 TALE-TFs 质粒、报告基因质粒和含有目的识别片段的质粒共转染进细胞,在报告基因荧光显微镜下确认转染效率的前提下,对细胞做定量 RT-PCR,验证 TALE-TFs 的转录活性。此方案结果虽然真实可靠,但是方法较为繁琐,包含转染、质粒构建和 RT-PCR,且 RT-PCR 的结果受质粒转染效率、mRNA 的提取效果,DNA 污染等诸多因素影响,于是本研究采用将目的基因和报告基因合二为一的质粒构建方案,并采用了课题组前期构建的 FSR 克隆技术,使得质粒构建快速高效。所获得的 pminCMV 转录效率验证质粒在结果验证方面表现更为直观,操作更为简洁。

参考文献

[1] Boch J, Bonas U. Xanthomonas AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function [J]. Annu Rev Phytopathol, 2010(48):419-436.

[2] Moscou MJ, Bogdanove AJ. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors [J]. Science, 2009, 326 (5959):1501.

[3] Boch J, Scholze H, Schornack S, et al. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors [J]. Science, 2009, 326 (5959):1509-1512.

[4] Zhang F, Cong L, Lodato S, et al. Efficient construction of sequence-specific TAL effectors for modulating mammali-

- an transcription[J]. Nat Biotechnol, 2011, 29(2): 149-153.
- [5] Miller JC, Tan S, Qiao S, et al. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing[J]. Nat Biotechnol, 2011, 29(2): 143-148.
- [6] Morbitzer R, Romer P, Boch J, et al. Regulation of selected genome loci using de novo-engineered transcription activator-like effector (TALE)-type transcription factors[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(50): 21617-21622.
- [7] Geissler R, Scholze H, Hahn S, et al. Transcriptional activators of human genes with programmable DNA-specificity[J]. PLoS One 2011, 6(5): e19509.
- [8] Hu JL, Cui J, Guo JJ, et al. Phenotypic assay of a hepatitis B virus strain carrying an rtS246T variant using a new strategy[J]. J Med Virol, 2012, 84(1): 34-43.
- [9] Miller JC, Tan SY, Qiao GJ, et al. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing[J]. Nat Biotechnol, 2011, 29(2): 143-148.
- [10] Sanjana NE, Cong L, Zhou Y, et al. A transcription activator-like effector toolbox for genome engineering[J]. Nat Protoc, 2012, 7(1): 171-192.
- [11] Sander JD, Cade L, Khayter C, et al. Targeted gene disruption in somatic zebrafish cells using engineered TALENs[J]. Nat Biotechnol, 2011, 29(8): 697-698.
- [12] Huang XA, Zhou MG, Zhu ZY, et al. Heritable gene targeting in zebrafish using customized TALENs[J]. Nat Biotechnol, 2011, 29(8): 699-700.
- [13] Hockemeyer D, Wang H, Kiani S, Lai CS, et al. Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases[J]. Nat Biotechnol, 2011, 29(8): 731-734.
- [14] Schmid-Burgk JL, Schmidt T, Kaiser V, et al. A ligation-independent cloning technique for high-throughput assembly of transcription activator-like effector genes[J]. Nat Biotechnol, 2012, 31(1): 76-81.
- [15] Weber E, Gruetznern R, Werner S, et al. Assembly of designer TAL effectors by golden gate cloning[J]. PLoS One, 2011, 6(5): e19722.
- [16] Cermak T, Doyle EL, Christian M, et al. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting[J]. Nucleic Acids Res, 2011, 39(12): e82.
- [17] Li T, Huang S, Zhao X, et al. Modularly assembled designer TAL effector nucleases for targeted gene knockout and gene replacement in eukaryotes[J]. Nucleic Acids Res, 2011, 39(14): 6315-6325.
- [18] Morbitzer R, Elsaesser J, Hausner J, et al. Assembly of custom TALE-type DNA binding domains by modular cloning[J]. Nucleic Acids Res, 2011, 39(13): 5790-5799.

(收稿日期: 2014-11-08 修回日期: 2015-02-16)

(上接第 2078 页)

本组病例虽然取得多发性肝 CHL 栓塞技术操作成功率高、治疗效果良好、并发症少等成果,但因病例数相对较少,缺乏多中心、大宗病例的证实,相关长期疗效、并发症、安全性等需与多中心联合研究进一步提供询证医学证据。

通过相关文献及本研究发现,以平阳霉素碘化油乳剂及明胶海绵微粒超选择性插管栓塞肝多发肝海绵状血管瘤,具有技术操作成功率高、创伤小、安全性高、疗效明显、并发症少等优势,且远期疗效肯定,可作为该疾病的首选治疗方法予以推广。

参考文献

- [1] 欧阳墉,张学军,欧阳雪晖,等.肝海绵状血管瘤的研究进展-图例式阐述[J].介入放射学杂志,2012,21(1):1-6.
- [2] Zeng QL, Li YH, Chen Y, et al. Gigantic cavernous hemangioma of the liver treated by Intra-arterial embolization with pingyangmycin-lipiodol emulsion: a multi-center study[J]. Cardiovasc Inter Radiol, 2004, 27(4): 481-485.
- [3] Kretschmar O, Knirsch W, Bernet V. Interventional treatment of a symptomatic neonatal hepatic cavernous hemangioma using the Amplatzer vascular plug[J]. Cardiovasc Inter Radiol, 2008, 31(2): 411-414.
- [4] 郭武华,冯龙,徐华,等.平阳霉素碘化油乳剂联合无水乙醇治疗巨大肝海绵状血管瘤[J].中国介入影像与治疗学, 2008, 5(5): 353-356.
- [5] 张学军,欧阳墉,马和平,等.平阳霉素碘化油栓塞术治疗肝海绵状血管瘤的远期疗效分析[J].中华放射学杂志, 2010, 44(3): 298-302.
- [6] 卢伟,李彦豪,陈勇.肝海绵状血管瘤 CO₂-DSA 与常规 DSA 比较研究[J].中国医学影像学杂志, 1998, 6(3): 278-281.
- [7] 王精兵,安潇,王悍,等.无水乙醇-碘油栓塞治疗肝脏海绵状血管瘤[J].介入放射学杂志, 2010, 19(5): 358-360.
- [8] 范瑞芳,柴福录,贺冠宪,等.外科切除联合射频消融治疗多发性肝脏海绵状血管瘤[J].中国普通外科杂志, 2007, 16(3): 294-295.
- [9] 崔彦,吉敏,李晓鸥,等.肝脏良性肿瘤的射频微创治疗[J].中国普通外科杂志, 2006, 15(1): 76-77.
- [10] 官彬,罗小平.平阳霉素碘化油超选择性动脉插管栓塞肝海绵状血管瘤的价值探讨[J].重庆医学, 2009, 38(12): 1497-1498.
- [11] 魏鼎泰,林施峰,辛勇通,等.不同栓塞剂对肝脏海绵状血管瘤的疗效评价[J].影像诊断与介入放射, 2007, 16(6): 279-282.
- [12] 黄晓强.肝海绵状血管瘤介入治疗的并发症[J].中国实用外科杂志, 2002, 22(7): 394-395.
- [13] 周胜利,王宗盛,张根山,等.肝海绵状血管瘤介入治疗及并发症预防[J].介入放射学志, 2006, 15(6): 370-372.

(收稿日期: 2014-10-08 修回日期: 2015-02-16)