

免疫与感染

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000179

乙型肝炎病毒全基因组 1.3 倍体重组腺病毒的构建与表达

曹漪伊¹, 曲嘉琳¹, 杨庆¹, 万雪梅², 唐颖慧², 蒋菁蓉², 汤华¹

(1. 重庆医科大学感染性疾病与分子生物学教育部重点实验室, 重庆 400016;

2. 成都中医药大学附属第一医院感染科, 成都 610041)

【摘要】目的:构建乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)重组腺病毒,为 HBV 的相关研究提供一种高效率、便捷的实验手段。**方法:**将 HBV1.3 倍体的片段构建到 pAdTrack-T04 穿梭载体上,再经限制性核酸内切酶 *Pme* I 线性化后转入含有腺病毒骨架载体 pAd-Easy1 的 BJ5183 感受态中进行重组并鉴定。鉴定正确后的重组腺病毒质粒经 *Pac* I 线性化后转染入 HEK-293 细胞进行病毒包装,获取 HBV1.3 倍体的重组腺病毒(Ad-HBV1.3)。通过荧光显微镜进行感染效率的检测;用 ELISA、Western blot 方法在蛋白水平检测 HBV 蛋白表达情况;小鼠尾静脉注射 HBV1.3 倍体的重组腺病毒,检测经腺病毒感染后的小鼠体内 HBV 表达情况。**结果:**在 Ad-HBV1.3 腺病毒感染后,细胞的感染效率可达到 95%以上;ELISA 实验检测实验组乙型肝炎 s 蛋白(hepatitis B virus S protein, HBs)、乙型肝炎 e 蛋白(hepatitis B virus E protein, HBe)表达量明显高于对照组;Western blot 结果显示感染 Ad-HBV1.3 腺病毒后可有高水平的 HBs 表达;动物实验显示小鼠在注射 Ad-HBV1.3 腺病毒后体内 HBs 在第 3 天即可开始表达,5 d 达到峰值,7 d 后逐渐下降。**结论:**本研究成功构建了可表达 HBV 的重组腺病毒,其感染效率可高达 95%,为 HBV 相关研究提供一种简单高效的研究手段。

【关键词】乙肝病毒;腺病毒;感染;乙型肝炎 S 蛋白**【中图分类号】**R781.5**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2013-10-22

Construction of recombinant adenovirus hepatitis B virus1.3 and its expression

Cao Yiyi¹, Qu Jialin¹, Yang Qing¹, Wan Xuemei², Tang Yinghui², Jiang Jingrong², Tang Hua¹

(1. Key Laboratory of Molecular Biology on Infectious Diseases, Ministry of Education Chongqing Medical University; 2. Department of Infection, the First Affiliated Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine)

【Abstract】Objective: To construct the recombinant adenovirus vector of hepatitis B virus (HBV) and to provide a more effective and convenient method for HBV-related research. **Methods:** HBV 1.3 fold genome was subcloned to shuttle vector pAdTrack-T04, then pAdTrack-T04-HBV1.3 was linearized by *Pme* I and transfected into BJ5183 cells containing pAd-Easy1. The confirmed recombinant plasmid with *Pac* I restriction endonuclease was linearized and transfected into HEK-293 cells to generate recombinant adenoviruses containing HBV1.3 fold genome. Efficiency of the infection was detected by fluorescence microscope and expression of HBV proteins was tested by ELISA and Western blot. Intravenous recombinant adenovirus HBV1.3 was injected into C57BL mouse and changes of HBs expression in mouse were observed. **Results:** Cellular efficiency of recombinant adenovirus HBV1.3 infection could reach above 95%. Expression of HBs and HBe in experimental group was much higher than that in control group according to ELISA test. High-level HBs expression was detected by Western blot after recombinant adenovirus HBV1.3 infection. Animal experiment showed that after being injected with the recombinant adenovirus HBV1.3, HBs began to express on the 3rd d, peaked on the 5th d and declined gradually on the 7th d. **Conclusion:** Recombinant adenovirus with high infective efficiency is constructed and can express HBV easily, providing a much more efficiency method for HBV-related study.

【Key words】hepatitis B virus; adenovirus; infection; hepatitis B virus S protein

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)是世界范围人类普遍存在和感染严重的病毒之一,当前世

作者介绍:曹漪伊, Email: 345269799@qq.com,

研究方向:HBV 相关性肝癌机制研究。

通信作者:汤华, Email: tanghua86162003@aliyun.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:30771924);重庆市科委面上资助项目(编号:2010BB5359)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000179.html>

界人口中约有 5% 的人感染了 HBV^[1]。我国是 HBV 感染的高发区,每年约有 10%~20% 的急性乙型肝炎将转成慢性肝炎,肝硬化甚至发展成原发性肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC),严重威胁着人们的健康。因此,急性乙型肝炎的慢性化及慢性肝炎癌变的发生机制是多年来肝病研究的重点,而进行病毒体外研究是 HBV 相关疾病研究的重要方法。

传统的 HBV 体外研究方法基本是通过转染试剂(如脂质体等)在细胞中转染 HBV 的表达质粒,但这种方法存在着转染效率低和转染试剂对细胞毒性大的弊端。因此,寻找一种新的 HBV 在宿主中表达的方式变得尤为重要。

HBV1.3 倍体是在 HBV1.1 倍体上游加入其自身启动子,形成 HBV1.3 倍体,使其依赖自身启动子启动转录,这样可以充分反映病毒株的自身复制情况,便于研究 HBV 复制和转录调节的全过程。本文通过构建含有 HBV1.3 倍体基因组的重组腺病毒,为 HBV 的复制及致癌机理等方面研究提供更真实、高效的研究方法。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株 质粒 pSEH-HBV1.3、pAdTrack-TO4,菌株 DH5 α 、BJ5183(AdEasy-1+)均由本实验室保存。用 Ad-GFP 作为阴性对照组,Ad-GFP 由本实验室保存,可以表达绿色荧光蛋白但不表达 HBV。

1.1.2 细胞系 HEK-293 细胞、SMMC-7721 细胞由本实验室保存。

1.1.3 主要试剂 Premix Taq[®] Version2.0, Cloned Alkaline Phosphatase(CIAP)购自中国 Takara 公司,T4 连接酶购自美国 Promega 公司,限制性内切酶 *Hind* III、*Pme* I、*Pac* I 购自美国 NEB 公司,转染试剂脂质体 2000[™] 购自美国 Invitrogen 公司,乙型肝炎 s 蛋白(hepatitis B virus S protein,HBs)和乙型肝炎 e 蛋白(hepatitis B virus E protein,HBe)ELISA 检测试剂盒购买于上海科华生物工程股份有限公司,胶回收试剂盒购自中国天根生化科技有限公司,BCA 法蛋白浓度检测试剂盒和 SDS-PAGE 凝胶配制试剂购买于碧云天生物技术研究所,马抗 HBs 抗体购买于美国 Abcam 公司,羊抗马抗体由本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 重组腺病毒的构建 将实验室构建好的 pSEH-HBV1.3 质粒用 *Hind* III 酶切后胶回收获取 HBV1.3 倍体基因片段与同样用 *Hind* III 酶切,经 CIAP 处理、纯化后的 pAdTrack-TO4 载体连接,分别用 PCR、酶切、基因测序等方法进行鉴定;鉴定正确的质粒 pAdTrack-TO4-HBV1.3 用 *Pme* I 酶切、纯化后转入含有 AdEasy-1 的 BJ5183 转化感受态中进行重组,经菌落初筛后将疑似阳性菌落扩大培养提取质粒小抽,用 *Pac* I 进行酶切鉴定;鉴定正确后的重组腺病毒表达质粒转入 DH5 α 放大培养,提取质粒小抽备用;重组腺病毒表达质粒经 *Pac* I 酶切线性化后用脂质体 2000[™] 转染入 HEK-293 细胞,进行病毒包装^[2]。

1.2.2 细胞培养 HEK-293 细胞和 SMMC-7721 细胞培养于含有 10%胎牛血清(GIBCO)、1%青链霉素(HyClone)的改良型 RPMI1640 培养基(HyClone)中,培养于 37℃,5%CO₂

的培养箱中。

1.2.3 ELISA 法检测 HBs 和 HBe 表达

1.2.3.1 ELISA 法检测 HBs 表达 在 ELISA 反应板中加入 75 μ l 感染腺病毒后的细胞培养液和阴、阳性对照,37℃孵育 60 min 后分别加入 50 μ l 酶结合物,振荡器轻微震荡 10 s 后 37℃孵育 30 min,取出反应板洗涤 5 次后拍干,加入显色液 A、B 各 50 μ l,轻微震荡后 37℃孵育 30 min,每孔加 50 μ l 终止液,震荡混匀,酶标仪 450 nm 波长读数。

1.2.3.2 ELISA 法检测 HBe 表达 在 ELISA 反应板中加入 50 μ l 感染腺病毒后的细胞培养液和阴、阳性对照,再分别加入 50 μ l 酶结合物,振荡器轻微震荡 10 s 后 37℃孵育 30 min,取出反应板洗涤 5 次后拍干,加入显色液 A、B 各 50 μ l,轻微震荡后 37℃孵育 15 min,每孔加 50 μ l 终止液,震荡混匀,酶标仪 450 nm 波长读数。

1.2.4 Western blot 分析 用含有 PMSF 的 RIPA 溶液(包含 50 mmol/L Tris-HCl,pH 7.4,150 mmol/L 氯化钠,1% NP40,0.5%脱氧胆酸钠,0.1%十二烷基硫酸钠,以及原钒酸钠、氟化钠、二乙胺四乙酸、亮抑酶肽等多种抑制剂)提取蛋白质,经 BCA 法检测浓度后按剂量加入 SDS 上样缓冲液于 12% SDS-PAGE 进行电泳。电泳后 90 V 转入 PVDF 膜,后用 5%脱脂牛奶封闭,孵一抗,TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,孵二抗,洗膜,最后加入化学发光剂进行曝光。

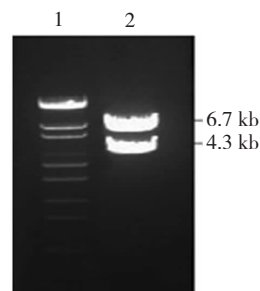
1.2.5 重组腺病毒 Ad-HBV1.3 在动物体内表达 HBs 的检测 分别用 Ad-HBV 1.3 最适病毒滴度尾静脉注射 C57BL 小鼠,分别于注射后第 3、5、7、11 天采集小鼠血液用 ELISA 检测 HBs 表达。用不表达 HBV 的 Ad-GFP 作为阴性对照组。

1.2.6 重组腺病毒 Ad-HBV1.3 病毒滴度的检测 用绿色荧光蛋白标记法计算病毒滴度^[3]。

2 结果

2.1 重组质粒 pAdTrack-TO4-HBV1.3 的构建和鉴定

2.1.1 HBV1.3 倍体基因片段的获取 利用实验室构建并保存的质粒 pSEH-HBV1.3^[4]用 *Hind* III 酶切后得到 6.7 kb 大小载体和 4.3 kb 大小目的条带,胶回收获取 HBV1.3 倍体基因片段(图 1)。

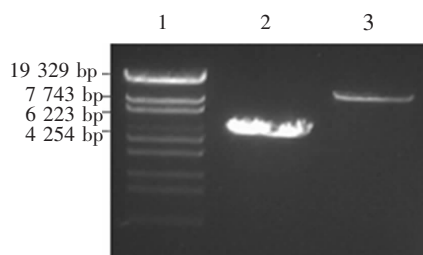


1. λ -EcoT14 I digest DNA Marker; 2. *Hind* III 酶切 pSEH-HBV1.3 质粒现 HBV1.3 倍体目的片段(4.3 kb)和质粒载体片段(6.7 kb)

图 1 质粒 pSEH-HBV1.3 酶切得到 HBV1.3 倍体基因片段

Fig.1 Fragment of 1.3-fold HBV genome obtained from the plasmid pSEH-HBV1.3

2.1.2 穿梭载体的线性化和预处理 将穿梭载体 pAdTrack-TO4 用 *Hind*Ⅲ 酶切纯化,再用 CIAP 处理后用于与 HBV1.3 倍体基因片段连接反应(图 2)。



1. λ-EcoT14 I digest DNA Marker; 2. HBV1.3 倍体基因片段;
3. *Hind*Ⅲ 酶切后的线性化 pAdTrack-TO4 穿梭质粒 (9.0 kb)

图 2 穿梭载体 pAdTrack-TO4 酶切线性化

Fig.2 Linearization of shuttle vector pAdTrack-TO4

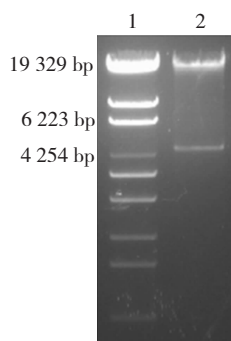
2.1.3 重组质粒 pAdTrack-TO4-HBV1.3 的鉴定

2.1.3.1 *Hind*Ⅲ 单酶切鉴定 将构建好的 8 个重组质粒 pAdTrack-TO4-HBV1.3 均用 *Hind*Ⅲ 酶切进行单酶切鉴定,酶切后均可见 1 条约 9 kb 载体条带和 1 条 4.3 kb 目的条带,与预期结果相符,说明 HBV1.3 倍体的片段成功连接到穿梭载体上。

2.1.3.2 HBV1.3 倍体基因片段插入方向的确定 因为目的片段和穿梭载体均为单酶切,因此为了确保基因片段为正向插入,用载体上正向引物与目的片段上反向引物进行 PCR 扩增,以 pCDNA-HBV1.1 质粒为阳性对照。实验结果显示 8 个阳性克隆中只有 3 号可扩增出明显阳性条带,因此只有 3 号克隆为基因片段正向插入的重组质粒(数据未显示)。

2.2 pAdTrack-TO4-HBV1.3 与 AdEasy-1 重组鉴定

线性化的 pAdTrack-TO4-HBV1.3 与 AdEasy-1 在 BJ5183 感受态中重组后用 *Pac* I 进行酶切鉴定,可见 1 条大于 19 kb 条带和 1 条 4.5 kb 条带,说明重组成功^[2](图 3)。



1. λ-EcoT14 I digest DNA Marker; 2. *Pac* I 酶切重组腺病毒质粒,可见 HBV1.3 倍体片段 (4.3 kb)

图 3 重组腺病毒质粒 *Pac* I 酶切鉴定

Fig.3 Identification of recombinant adenovirus plasmid by *Pac* I digestion

2.3 荧光显微镜检测重组腺病毒感染效率

腺病毒包装成功后按一定病毒滴度感染 HEK-293 细

胞,24 h 后观察细胞中绿色荧光蛋白表达情况。结果显示在感染腺病毒 24 h 后,存在绿色荧光蛋白表达的细胞可达 95% 以上,说明重组腺病毒 Ad-HBV1.3 的感染效率可达 95% 以上(图 4)。

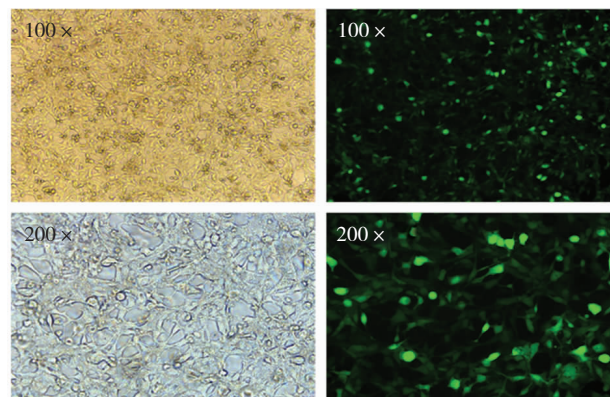


图 4 重组腺病毒感染 HEK-293 细胞感染效率检测

Fig.4 Detection of infection efficiency of recombinant adenovirus in HEK-293 cells

2.4 细胞上清中 HBs 与 HBe 表达量检测

将一定滴度下不同体积的重组腺病毒 Ad-HBV1.3 分别感染 HEK-293 细胞和 SMMC-7721 细胞,48 h 后取细胞上清分别用 HBs 和 HBe ELISA 检测试剂盒检测感染腺病毒后细胞中的 HBs 和 HBe 的表达量。实验发现 HEK-293 细胞和 SMMC-7721 细胞中均有 HBs 和 HBe 的表达(图 5)。

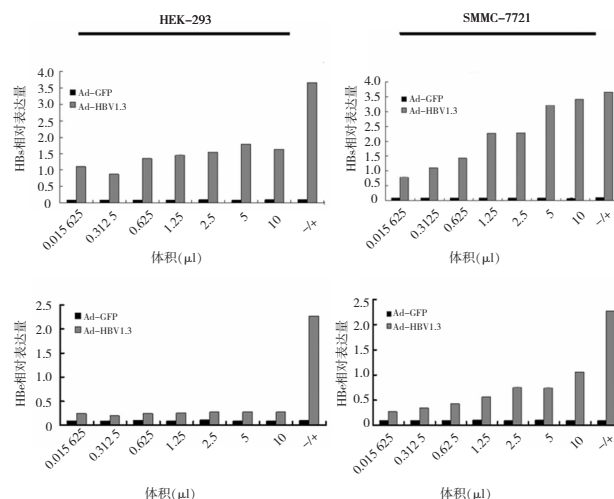


图 5 重组腺病毒感染 HEK-293 细胞和 SMMC-7721 细胞后 HBs 和 HBe 表达检测

Fig.5 Expressions of HBs and HBe in recombinant adenovirus infected HEK-293 cells and SMMC-7721 cells

2.5 Western blot 检测细胞中 HBs 的表达

用重组腺病毒 Ad-HBV1.3 感染 HEK-293 细胞,48 h 后提取细胞蛋白,用 Western blot 方法检测细胞中 HBs 的表达。与 Ad-GFP 的细胞相比,在感染重组腺病毒 Ad-HBV1.3 后的细胞中有较高水平 HBs 的表达(图 6)。

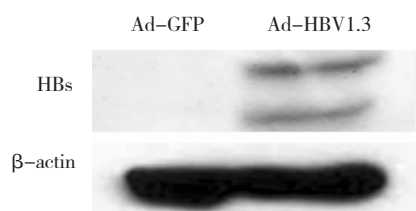


图 6 重组腺病毒感染 HEK-293 细胞后 HBs 水平表达验证

Fig.6 Verification of expression of HBs in HEK-293 cells infected with recombinant adenovirus

2.6 重组腺病毒 Ad-HBV1.3 在动物体内表达 HBs 的检测

选择最适病毒滴度尾静脉注射 C57BL 小鼠,分别于注射后第 3、5、7、11 天采集小鼠血液用 ELISA 检测 HBs 表达。结果发现与对照组相比,实验组小鼠在注射重组腺病毒 Ad-HBV1.3 后 3 d 开始即可检测出有 HBs 表达(1.24 ± 0.964),5 d 达到峰值(2.07 ± 1.061),7 d 开始逐渐下降(0.414 ± 0.277),11 d 后不再表达(0.115 ± 0.03)。实验证实构建的含有 HBV1.3 倍体基因的重组腺病毒 Ad-HBV1.3 在动物体内也可表达较高水平的 HBs 表达,说明构建的重组腺病毒 Ad-HBV1.3 是可以成功表达 HBV 蛋白的(图 7)。

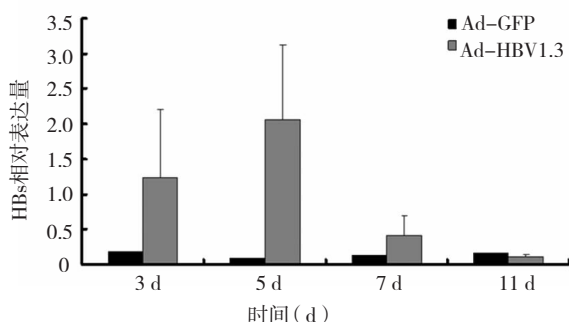


图 7 动物实验验证重组腺病毒可有效表达 HBs

Fig.7 Verification of efficient expression of HBs in animal models infected with recombinant adenovirus

3 讨论

重组腺病毒是复制缺陷的载体,可广泛应用于基因治疗、疫苗治疗和基础的生物学研究^[5-8]。重组腺病毒存在广泛的生物学特征,如腺病毒转移基因无细胞类型的限制,基因的转移不依赖于细胞分化能力的强弱。最重要的是重组腺病毒可以较轻松地获得转基因的高水平表达^[9]。我国是 HBV 感染的重灾区,因此对于 HBV 致病机制的研究就显得相当重要。但是目前对 HBV 研究普遍使用的是质粒转染的方式,这种方式操作虽然简单但效率却不尽人意,因此构建一种可以高效表达 HBV 的载体对于

HBV 的体外研究非常有必要。

本实验成功构建了可以完整表达 HBV 的重组腺病毒 Ad-HBV1.3,荧光显微镜观察到其感染细胞效率可达到 95%。而传统的 HBV 表达质粒,用脂质体转染细胞只能达到 30%~50%,对转染 HepG2 肝癌细胞只能达到 20%的转染效率,对研究 HBV 的功能,有一定的限制。本实验构建的重组腺病毒 Ad-HBV1.3,能大幅度提高对 HepG2 肝癌细胞的转染效率,同时 ELISA 和 Western blot 实验结果表明细胞感染 Ad-HBV1.3 后有较高水平的 HBs 表达。在 C57BL 小鼠尾静脉注射重组腺病毒 Ad-HBV1.3,注射后第 3 天开始即可检测出有 HBs 表达,5 d 达到峰值,7 d 开始逐渐下降。以上这些实验结果表明本课题所构建的重组腺病毒 Ad-HBV1.3 确实能高效感染细胞并且可以在体内外成功表达 HBV。

动物实验伊始将小鼠共分为 4 组:对照组、低滴度组、中滴度组、高滴度组,每组各 3 只小鼠,注射量以磷酸盐缓冲液稀释后不足 200 μ l。但实验发现高滴度组小鼠尾静脉注射腺病毒后 20 min 内全部死亡,分析原因很可能是小鼠本身不能耐受高滴度腺病毒的毒性。而低滴度组小鼠注射腺病毒后几个时间点均未检测到其体内有 HBs 的表达,因此选择中滴度组为最终实验组。由于动物实验中部分小鼠死亡,最终在低滴度组只剩下 3 只小鼠(样本量太少),最后测得的结果标准差太大,没有统计学意义。因此这一实验结果还需在大量小鼠中进行验证。其实在 2001 年 Martin 等^[1]就已经用类似的方法构建了过表达 HBV 的腺病毒,并且证实这种方法构建的腺病毒是可以在活体内表达 HBV^[1]。

重组腺病毒 Ad-HBV1.3 不仅有高的感染效率,同时腺病毒系统具有易于制备和扩增,感染细胞广泛,仅瞬间表达,安全性高,进入细胞内并不整合到宿主细胞基因组等优点^[10]。本实验构建的重组腺病毒 Ad-HBV1.3,在国内尚无报道,该实验结果,为进一步研究 HBV 的生物学功能奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Martin FS, Heike O, Heinz S, et al. Transfer of Hepatitis B virus genome by adenovirus vectors into cultured cells and mice; crossing the species barrier[J]. Journal of Virology, 2001, 75(11): 5108-5118.
- [2] Luo JY, Deng ZL, Luo XJ, et al. A protocol for rapid generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system[J]. Nature Protocols, 2007, 2(5): 1236-1247.

免疫与感染

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000172

白介素-16 基因多态性与膝骨性关节炎的易感性研究

罗世兴¹, 张均锦¹, 龙光华¹, 董桂甫¹, 苏伟², 秦雪³

(1. 广西医科大学第九附属医院骨科, 北海 536000; 2. 广西医科大学第一附属医院创伤骨科手外科, 南宁 530021;

3. 广西医科大学第一附属医院临床检验中心, 南宁 530021)

【摘要】目的:探讨汉族人群中白介素-16(interleukin-16, IL-16)基因单核苷酸多态性与膝骨性关节炎(knee osteoarthritis, KOA)的相关性。**方法:**采用“病例-对照”研究方法, 纳入 150 例汉族 KOA 患者与 147 例非 KOA 受试者, 其年龄、性别、体质指数相匹配。采用苯酚氯仿法提取外周血白细胞基因组 DNA, 聚合酶链反应限制性片段长度多态性的方法检测 IL-16 基因 rs11556218、rs4072111 和 rs4778889 3 个位点与 KOA 的遗传易感相关性, 并用基因测序验证结果。**结果:**病例组和对照组中 3 个位点基因型分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡。KOA 组 rs11556218 的 T/G 基因型频率高于非 KOA 的人群($OR=2.06$, $95\%CI=1.26\sim3.35$, $P=0.005$), G/G 也明显增加发病风险($OR=2.52$, $95\%CI=1.10\sim5.74$, $P=0.005$), rs4072111 的 C/T 基因型 KOA 的发病风险较 C/C 基因型明显增加($OR=2.45$, $95\%CI=1.42\sim4.22$, $P=0.000$), T/T 也明显增加发病风险($OR=4.04$, $95\%CI=1.06\sim15.37$, $P=0.000$); rs11556218 与 rs4778889 存在连锁不平衡关系($D'=0.63$, $R^2=0.236$), 单倍型 TTT 增加 KOA 的发病风险($OR=3.70$, $95\%CI=1.57\sim8.72$, $P=0.003$), GCC 也增加了 KOA 的发病风险($OR=6.22$, $95\%CI=2.37\sim16.33$, $P=0.000$)。**结论:**汉族人群中 IL-16 基因多态性可能与 KOA 易感性有关。

【关键词】膝; 骨性关节炎; 多态性; 单核苷酸; 白介素-16**【中图分类号】**R394.5, R684.3**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2013-05-22

Association between susceptibility of knee osteoarthritis and genetic polymorphism of interleukin-16

Luo Shixing¹, Zhang Junjing¹, Long Guanghua¹, Dong Guifu¹, Su Wei², Qin Xue³

(1. Department of Orthopedics, the Ninth Affiliated Hospital of Guangxi Medical University; 2. Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University; 3. Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University)

【Abstract】Objective: To evaluate the association between the susceptibility of knee osteoarthritis(KOA) and the gene polymorphisms**作者介绍:** 罗世兴, Email: luosong888aaa@gmail.com,

研究方向: 关节外科, 分子生物学。

通信作者: 董桂甫, Email: 578908889@qq.com。**基金项目:** 广西卫生厅科研课题资助项目(编号: E2011064); 广西科技厅青年基金资助项目(编号: 2012GXNSFBA053124)。**优先出版:** <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000172.html>of interleukin-16 in Han population. **Methods:** A case-control design was employed in this study. A total of 150 patients diagnosed with primary KOA and 147 controls matched for age, sex and body mass index of Han ancestry were enrolled. Peripheral blood samples were collected, and the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis

[3] 孙鹏宇, 张艳玲, 荆玉明, 等. 腺病毒滴度不同测定方法比较[J]. 南方医科大学学报, 2011, 31(2): 234-238.

[4] Wang LY, Li YG, Chen K, et al. Stable expression and integrated hepatitis B virus genome in a human hepatoma cell line[J]. Genetics and Molecular Research, 2012, 11(2): 1442-1448.

[5] Graham FL, Prevec LA. Adenovirus-based expression vectors and recombinant vaccines[J]. Biotechnology, 1992(20): 363-390.

[6] Anderson WF. Human gene therapy[J]. Nature, 1998, 392(6679s): 25-30.

[7] Nadeau I, Kamen A. Production of adenovirus vector for gene ther-

apy[J]. Biotechnol, 2003(20): 475-489.

[8] McConnell MJ, Imperiale MJ. Biology of adenovirus and its use as a vector for gene therapy[J]. Hum Gene Ther, 2004(15): 1022-1033.

[9] He TC, Zhou SH, Luis TDC, et al. A simplified system for generating recombinant adenoviruses[J]. Medical Sciences, 1998(95): 2509-2514.

[10] Hitt MM, Addison CL, Graham FL, et al. Human adenovirus vectors for gene transfer into mammalian cells[J]. Adv Pharmacol, 1997(40): 137-206.

(责任编辑: 冉明会)