

技术前沿

DOI: 10.11699/cyxb20131205

rAd-preS1 基因治疗载体的构建及对肝细胞嗜向性检测

张 丽, 张明满, 朱晓梅, 贺小张

(重庆医科大学附属儿童医院儿科研究所, 重庆 400014)

【摘要】目的:制备携带 PreS1 基因的重组腺病毒基因治疗载体, 研究其对肝细胞的嗜向性。**方法:**设计合成含 PreS1 的腺病毒纤毛 Fiber 基因片段, 置换野生型骨架质粒 Fiber 片段, 同源重组法构建重组体 rAd-PreS1, 酶切鉴定后 HEK293 包装生成腺病毒, 抽提蛋白 Western blot 检测目的蛋白 PreS1 表达。重组腺病毒 rAd-preS1 分别转染人正常肝细胞 L02、人肺癌细胞 A549、人喉癌细胞 Hep2、人卵巢癌细胞 SKOV3, 同时野生腺病毒 rAd 作为阴性对照, 荧光显微镜下观察各细胞内绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 表达程度, 用细胞的病毒滴度值表示, 检测其对肝细胞的嗜向性。**结果:**经酶切鉴定成功构建 rAd-preS1 载体, Western blot 示蛋白分子量大小均约为 63 kD 目的条带。rAd-preS1 感染 L02 细胞组 GFP 表达程度明显强于 A549、Hep2 及 SKOV3 细胞组 (P 均是 0.000), 而 A549、Hep2 及 SKOV3 各细胞组间 GFP 表达差异无统计学意义 ($P>0.05$); 对照组各细胞组间 GFP 表达差异无统计学意义 ($P>0.05$)。**结论:**含 PreS1 的重组腺病毒 rAd-preS1 显示出对人肝细胞具有较强嗜向性, 而对非肝细胞无明显效果, 这为进一步研究肝脏疾病靶向基因治疗奠定了基础。

【关键词】重组腺病毒; PreS1 基因; 肝细胞嗜向性; 基因治疗

【中国图书分类法分类号】R512.6; R575

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-03-02

Construction of gene therapy vector rAd-preS1 and identification of liver cell targeting function

ZHANG Li, ZHANG Mingman, ZHU Xiaomei, HE Xiaozhang

(Children Research Center, the Children's Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To prepare the recombinant adenoviruses carrying gene fragment PreS1 and to detect tropism of liver cell infect-virus. **Methods:** Fiber DNA gene fragment containing PreS1 gene was designed and amplified and inserted into the pAdEasy-1. Fiber DNA gene fragment replaced wild fiber DNA fragment then produced rAd-preS1 by homogenous recombination. After being confirmed by restriction enzyme digestion, human embryonic kidney cell lines were transfected with pAd-preS1 to get rAd-preS1. Protein expression of preS1 was detected by Western blot. Human normal live cell L02, human lung cancer cell A549, human laryngeal cancer cell Hep2, human ovarian cancer cell SKOV3 were infected with rAd-preS1 respectively and rAd was taken as negative control group. Green fluorescent protein (GFP) expression of each cell were observed and manifested by virus titers. **Results:** Restriction digestion confirmed the consistent of recombinant vector. Western blot results showed that protein molecular weight was about 63 kD fragment stripe. Transfection results showed that GFP expression were higher in L02 group than in A549, Hep2, SKOV3 groups (P value were 0.000). There was no statistical difference in GFP expression among A549, Hep2 and SKOV3 groups ($P>0.05$). There was no statistical difference in GFP expression among control groups ($P>0.05$). **Conclusions:** Recombinant adenovirus vector rAd-preS1 demonstrate its function of tropism to liver cell in vitro, which will be the foundation for the research of gene therapy of PreS1 for hepatic diseases.

【Key words】recombinant adenovirus; PreS1 gene; liver cell targeting; gene therapy

肝脏疾病是威胁到人类健康的严重疾病之一, 包括肿瘤、遗传病及病毒性肝炎, 多年来关于肝脏

基因治疗的目的基因有很多, 但发展仍缓慢, 原因之一是缺乏高效特异靶向肝细胞的治疗载体。

PreS1 21~47 氨基酸 (amino acid, aa) 是乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 嗜肝性的主要分子机制之一, 研究已显示 HBV 大表面蛋白前 S1 区 (pre-S1) 抗原特定肽段能识别肝脏表面受体并特异

作者介绍: 张 丽, Email: kaixinyixiao10@163.com,

研究方向: 肝胆疾病。

通信作者: 张明满, Email: Zhangmingman-a@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 30871161)。

性结合,使病毒进入细胞^[1],亦有实验证明抗 preS1 单抗可特异阻断 HBV 与肝细胞或肝癌细胞结合^[2]。Dash 等^[3]研究者已证实 preS1 抗原肽段(21~47 位 aa)作为 HBV 与肝癌细胞明显的结合位点,同时前 S1 蛋白的 21~47 氨基端肽段也是 HBV 具有传染性的保守区段,只要这一段完整,变异的病毒也具有传染性^[4]。近几年的研究更清楚显示 HBV 嗜肝性是通过 N-末端的肉豆蔻酰化的 HBV 大蛋白前 S1 域特异性结合到肝细胞受体,在侵入肝细胞过程中起关键性作用^[5-6]。

重组腺病毒是常用的基因治疗载体,研究表明改变腺病毒衣壳上纤毛结构可改变靶向性^[7]。Mahareshti 等^[8]就以此将 mad-7 整合到病毒纤毛中获得了嗜卵巢癌细胞 rAd,但对腺病毒嗜肝细胞改造尚未见报道。因此本研究通过选择 PreS1 的 21~47aa 这一 HBV 锚定肝细胞的重要结合部位进行嗜肝性研究,构建嗜肝性基因治疗载体,并通过体外细胞实验检测其肝细胞嗜向性,为进一步肝脏疾病基因治疗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料

重组腺病毒载体系统中高表达载体系统 pAdEasy System、大肠杆菌 BJ5183/AD-1 购自于 Stratagene Inc。基因序列由南京金斯瑞生物科技有限公司合成,pUC57-Fiber 菌株于南京金斯瑞生物科技有限公司完成。大肠杆菌 TOP10 由重庆医科大学附属儿童医院儿研所保存。质粒提取试剂盒购自 Takara Inc。PCR 引物由上海 Invitron 公司合成。胶回收试剂盒、DNA 纯化试剂盒等购自北京康为生物科技公司。人正常肝细胞(L02)购自于重庆医科大学附属第二医院肝病研究所,人胚肾细胞(HEK293)、人卵巢癌细胞(SKOV3)、人喉癌细胞(Hep2)、人肺癌细胞(A549)由重庆医科大学附属儿童医院儿研所保存。

1.2 方法

1.2.1 重组腺病毒载体质粒 pAdEasy-PreS1 的构建及鉴定

1.2.1.1 含 PreS1(21~47aa)的纤毛 Fiber 基因片段合成 在重组腺病毒野生纤毛 HI loop 中插入 HBV 表面蛋白中嗜肝段 PreS1(21~47 位 aa)的编码基因片段。设计出含有 PreS1 21~47 aa 的 Fiber 合成基因序列,由南京金斯瑞生物科技有限公司进行合成,合成基因大小:2 081 bp。

其中 PreS1 的 21~47 位 aa 肽段的编码基因片段序列为:CCCCTGGGATTCTTCCCCGATCATCAGTTGGATCCAGC-A-TTCAAAGCCAACTCAGAAAATCCAGATTGGGACCTCAA-CCCG(GGATCC 序列为引入的 BamH I 酶切位点)。

1.2.1.2 重组腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1-PreS1 的构建 用胶回收试剂盒分离、纯化后回收 Fiber DNA,转化 BJ5183/AD-1 感受态细胞。取转化后细胞涂于含 Amp 50 $\mu\text{g/ml}$ LB

琼脂培养板过夜,选择最小的单菌落 400 个加入含 Amp 50 $\mu\text{g/ml}$ LB 培养基振荡过夜,小规模质粒抽提试剂盒提取质粒 pAdEasy-1-PreS1,筛选出携带 PreS1 的重组质粒 pAdEasy-1-PreS1,阳性克隆命名为 BJ5183/pAdEasy-1-PreS1。取 5 μl 上述阳性重组质粒加入 200 μl TOP10 感受态细胞中振荡混匀,冰孵 45 min;42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴箱中热击 90 s;涂于 LB 琼脂培养板上培养过夜。pAdEasy-1-PreS1 质粒进行抽提,BamH I 酶进行酶切鉴定。同时将重组质粒 pAdEasy-1-PreS1 送出进行 DNA 序列分析。

1.2.1.3 同源重组体 pAd-preS1 的构建及包装 取质粒 pAdTrack-CMV 转化 TOP10 感受态细胞,提取质粒 pAdTrack-CMV,经 *pme* I 酶切线性化后凝胶分离试剂盒分离、纯化,转化 BJ5183/pAdEasy-1-preS1 感受态细胞,以含 Kan+50 $\mu\text{g/ml}$ LB 培养基平板筛选单克隆,于含 Kan+50 $\mu\text{g/ml}$ LB 培养基中 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜,大规模质粒抽提试剂盒抽提质粒 pAd-preS1。采用脂质体法将转染 HEK293 细胞,7~10 d 有明显的细胞病理效应,倒置荧光显微镜下(100 $\times$)观察 HEK293 细胞中绿色荧光蛋白(green fluorescence protein,GFP)表达。收集细胞用 100 μl PBS 重悬,-80 $^{\circ}\text{C}$ /+37 $^{\circ}\text{C}$ 反复冻融 3 次,2 000 r/min 离心 5 min,收集病毒上清液。构建的重组腺病毒命名:rAd-preS1。

1.2.1.4 重组腺病毒载体 rAd-preS1 鉴定及扩增 将重组载体质粒 pAd-preS1 进行酶切鉴定,Western blot 法测定腺病毒蛋白表达,抽提重组腺病毒 rAd-preS1 感染的 HEK293 细胞总蛋白,与抗 preS1 单抗结合反应,一步法快速 WB(HRP)试剂盒进行封闭及孵育抗体,高灵敏度化学发光检测试剂盒进行曝光显色。重组腺病毒载体 rAd-preS1 反复感染 293 细胞,收集病毒,-80 $^{\circ}\text{C}$ /+37 $^{\circ}\text{C}$ 反复冻融,保存获得大量病毒。

1.2.2 实验分组

1.2.2.1 实验组 携 PreS1 的重组腺病毒 rAd-preS1 感染人肺癌细胞 A549、人喉癌细胞 Hep2、人卵巢癌细胞 SKOV3 和人正常细胞 L02 4 种细胞,分别记为 A、B、C、D 组。

1.2.2.2 对照组 不含目的基因的野生腺病毒 rAd 感染上述 A、B、C、D 4 个细胞组。

1.2.3 重组腺病毒 rAd-preS1 的体外肝细胞嗜向性检测

1.2.3.1 细胞培养及接种 分别培养人正常肝细胞(L02)、人肺癌细胞(A549)、人喉癌细胞(Hep2)及人卵巢癌细胞(SKOV3),制备细胞悬液,以 2×10^4 个/ml 密度接种于 24 孔培养板上,37 $^{\circ}\text{C}$ CO₂ 暖箱中培养。

1.2.3.2 细胞嗜肝细胞向性检测 待细胞密度达 80%左右时转染重组腺病毒 rAd-preS1,每孔分别用不同稀释浓度的重组病毒感染各种细胞(每种细胞设 3 种稀释浓度:10⁴、10⁵、10⁶,每个稀释度进行 3 复孔),培养过夜,24 h 后在显微镜(100 $\times$)下观察各种细胞 24 孔板中 GFP 表达程度,用病毒滴度值表示。计算 L02、A549、Hep2 及 SKOV3 各细胞中绿色荧光个数,各组细胞病毒感染滴度值(efu/ml)=每孔 GFP 数 $\times$ 稀释倍数/0.25。

1.2.3.3 对照 用相同的方法以野生腺病毒 rAd 感染同种细胞作为实验对照组。荧光显微镜(激发光为 488 nm,发射光波长为 507 nm 滤光片)检测各种细胞中 GFP 表达。

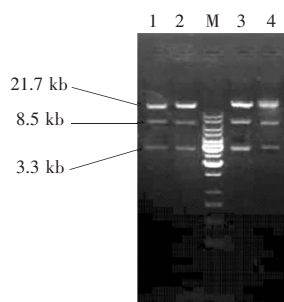
1.3 统计学处理

对原始数据各组进行分别记录比较,应用 SPSS 17.0 软件进行处理, rAd-preS1 感染各细胞病毒滴度值结果为计量资料,以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用单因素方差分析各组均值之间的差异性,两两比较用 LSD-*t* 法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 重组腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1-PreS1 的鉴定

用 Fiber DNA 转化 BJ5183/AD-1 菌株后用质粒抽提试剂盒提取质粒 pAdEasy-1-PreS1 之后再转化 Top10 感受态细胞, pAdEasy-1-PreS1 质粒抽提, BamH I 酶切鉴定,电泳条带示克隆成功。重组成功后有 3 个酶切位点, BamH I 酶切后片段分别为: 3 315、8 512、21 725 bp(图 1)。



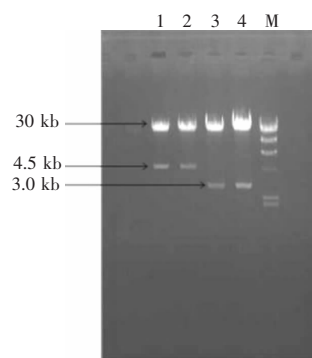
1. BamH I 酶切 pAdEasy-1-PreS1; 2. BamH I 酶切 pAdEasy-1-PreS1; 3. BamH I 酶切 pAdEasy-1-PreS1; 4. BamH I 酶切 pAdEasy-1-PreS1; M. DNA marker

图 1 重组腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1-PreS1 鉴定图

Fig.1 Identification of pAdEasy-1-PreS1 plasmid

2.2 重组腺病毒载体质粒 rAd-preS1 鉴定

重组腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1-PreS1 与穿梭质粒 pAdTrack-CMV 在大肠杆菌体内经典同源重组生成病毒质粒 pAd-PreS1, 经限制性核酸内切酶 Pac I 酶切后, 电泳图结果如下。Pac I 将质粒切成 2 条基因片段, 大片段 DNA 大小为 30 kb, 如果骨架质粒与穿梭质粒同源重组时重组位点发生在左臂, 则产生的小片段 DNA 大小为 3.0 kb, 如果同源重组时重组位点在复制的起点则产生的小片段 DNA 大小为 4.5 kb(图 2)。



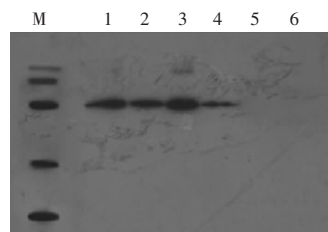
1. Pac I 酶切重组质粒 30 kb 和 3.0 kb 条带; 2. Pac I 酶切重组质粒 30 kb 和 3.0 kb 条带; 3. Pac I 酶切重组质粒 30 kb 和 4.5 kb 条带; 4. Pac I 酶切重组质粒 30 kb 和 4.5 kb 条带; M. λ -HindIII DNA marker

图 2 重组腺病毒质粒体内重组的鉴定

Fig.2 Identification of recombinant adenovirus plasmid

2.3 Western blot 测定 preS1 蛋白

病毒载体感染 HEK293 细胞后抽提蛋白, 得到蛋白分子大小均约为 63 kD(因 preS1 插入位于 Fiber 结构之中, 所以在电泳时是作为整体进行分离的)。结果提示插入的特定基因片段 preS1 在 Fiber 基因中表达, 能和抗 preS1 单抗相结合, 即用同源重组法插入的乙肝病毒中特定基因片段 preS1 翻译出了相应 preS1 多肽(图 3)。



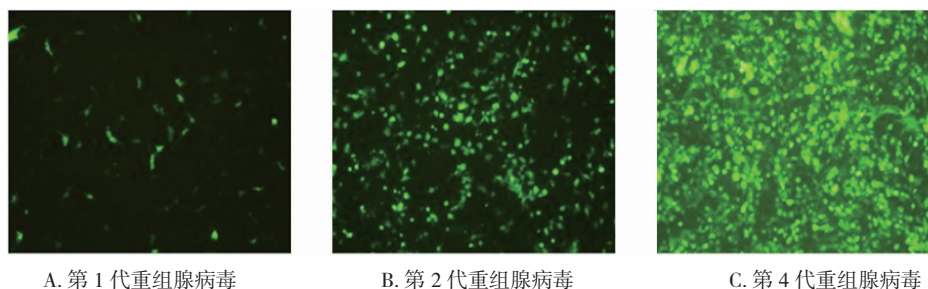
1. KD 的 preS1 目的蛋白; 2. KD 的 preS1 目的蛋白; 3. KD 的 preS1 目的蛋白; 4. KD 的 preS1 目的蛋白; 5. 阴性对照; 6. 阴性对照; M. Western blot 中分子量蛋白 Marker

图 3 Western blot 鉴定 preS1 蛋白表达

Fig.3 Expression of preS1 protein detected by Western blot

2.4 重组腺病毒扩增

重组腺病毒在 HEK293 细胞中包装成功, 荧光显微镜下可见 GFP 的表达(图 4)。同时将鉴定正确的病毒液以不同比例稀释重染 HEK293 细胞, 测得重组腺病毒滴度为 1.15×10^9 efu/ml。



A. 第 1 代重组腺病毒

B. 第 2 代重组腺病毒

C. 第 4 代重组腺病毒

图 4 重组腺病毒 rAd-preS1 的生成及扩增 (100 $\times$)

Fig.4 Gereration and amplification of rAd-preS1 (100 $\times$)

2.5 细胞实验检测重组腺病毒 rAd-preS1 肝细胞嗜向性结果

重组腺病毒 rAd-preS1 及野生腺病毒 rAd 感染 4 种细胞后荧光显微镜下 GFP 表达情况见图 5,对各细胞中 GFP 表达程度(病毒滴度值表示)进行统计分析,分别比较实验组、对照组各细胞组间及组内差别,见图 6、表 1,结果示 rAd-preS1 实验组 D 组 GFP 表达明显高于 A 组、B 组、C 组,差异

有统计学意义(A、B、C 组分别与 D 组比较 P 均是 0.000);A、B、C 组 GFP 表达差异无统计学意义(A、B 组间 $P=0.772$;A、C 组间 $P=0.897$;B、C 组间 $P=0.677$,均 >0.05);rAd 对照组 4 组间 GFP 表达差异亦无统计学意义。L02 细胞的实验组 GFP 表达明显高于对照组, $P=0.000$,而其他细胞实验组与对照组 GFP 表达差异无统计学意义。

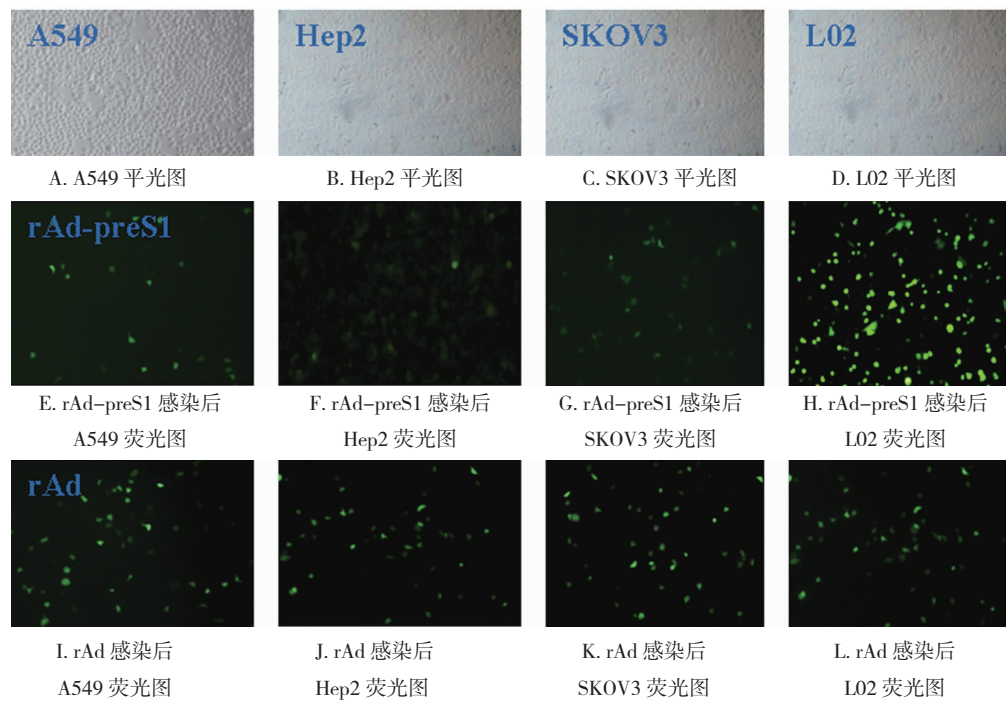


图 5 4 种细胞在 rAd-preS1 及 rAd 感染后的平光图片及荧光图片对比 (100 ×)

Fig.5 Comparison of ordinary light and fluorescent pictures of 4 kinds of cells after rAd-preS1 and rAd infection (100 ×)

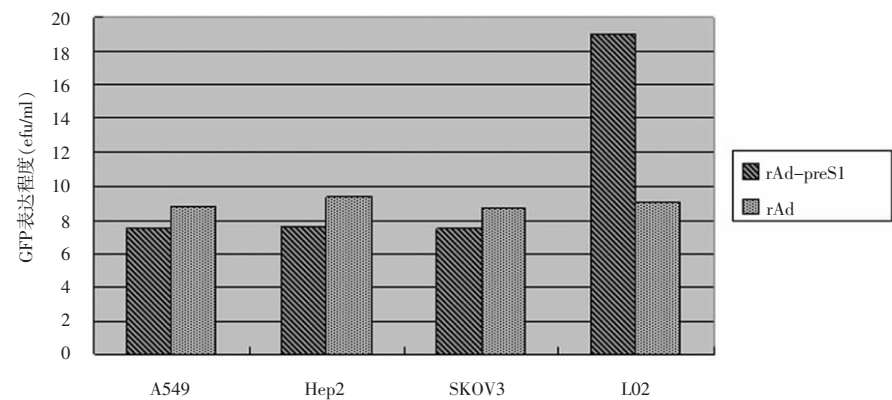


图 6 4 种细胞中重组腺病毒 rAd-preS1 及野生腺病毒 rAd 感染后结果比较 ($\times 10^6$)

Fig.6 Comparison of virus titers in A549,Hep2,SKOV3,L02 ($\times 10^6$)

表 1 实验组及对照组 4 种细胞感染滴度结果及比较分析 ($\times 10^6$ efu/ml, $\bar{x} \pm s$)						
Tab.1 Comparison of infection titer of four cells in experiment group and control group ($\times 10^6$ efu/ml, $\bar{x} \pm s$)						
组别	A组 (A549)	B组 (Hep2)	C组 (SKOV3)	D组 (L02)	F 值	P 值
实验组 rAd-preS1	7.47 $\pm$ 0.36 ^{ad}	7.56 $\pm$ 0.26 ^{bd}	7.43 $\pm$ 0.31 ^{cd}	18.96 $\pm$ 0.51 ^d	713.670	0.000
对照组 rAd	8.74 $\pm$ 0.41	9.39 $\pm$ 0.58	8.68 $\pm$ 0.47	9.03 $\pm$ 0.38	0.666	0.596

注:a,实验组 A 组与 B、C、D 组比较;b,B 组与 C、D 组比较;c,C 组与 D 组比较;d,实验组与对照组比较

3 讨 论

近年来,基因治疗在包括肿瘤在内的许多系统疾病的治疗方面已经取得明显进展,但基因治疗在肝脏疾病中的应用发展仍缓慢,阻碍基因治疗在肝脏疾病中应用的原因之一是缺乏高效的、特异的靶向肝细胞治疗载体。

目前对肝脏靶向性基因治疗载体的研究取得了一些进展,有国外研究者用逆转录病毒携带 HBVpreS1 和 S 基因^[9],或用甲胎蛋白上调调控元件替换病毒载体启动子达到肝细胞靶向性^[10],国内学者保留大部分 HBV 基因为前提试图对 HBV 进行改造^[11],但这些结果有致突变危险、包装效率差或仅对甲胎蛋白阳性肝细胞肝癌有作用等很多问题或不足,结果均不理想。本课题组研究者曾尝试改变腺相关病毒,但因其本身的一些特性病毒包装困难,使实验无法继续进行^[12]。而重组腺病毒基因治疗载体是以腺病毒为基础,用基因重组技术构建的具有复制缺陷的基因治疗载体,具有外源基因表达水平高,不整合入染色体中,致病力弱等多种优点^[13]。我们使用重组腺病毒 pAdEasy System 载体系统,在纤毛球域插入目的片段 preS1,合成含 PreS1 21~47 位 aa 肽段的新纤毛基因序列,置换野生纤毛基因序列,通过基因重组技术等方法构建重组质粒 pAd-preS1 并表达出特定肽段,由此改变组织嗜性,并未触及包装、复制等关键结构和信号,不影响到病毒包装和复制(然后转染 HEK293 细胞,生成重组腺病毒载体 rAd-preS1 并扩增)。

经作者改造过 Fiber 后所得的靶向性重组腺病毒载体 rAd-preS1 转染 HEK293 细胞,经检测目的基因 PreS1 可在增殖细胞中正常表达。用生成的重组腺病毒 rAd-preS1 分别感染 L02、Hep2、A549、SKOV3 等多种真核细胞,同时并用野生腺病毒做对照,观察了荧光显微镜下各种细胞中 GFP 的表达程度并计数,对各细胞感染滴度进行比较和统计分析。结果显示实验组 L02 细胞组和 Hep2、A549、SKOV3 细胞组的病毒滴度有显著性差异, Hep2、A549、SKOV3 细胞组间差异无统计学意义;而对照组中 L02、Hep2、A549、SKOV3 细胞组间差异无统计学意义;实验组 L02 细胞 GFP 表达明显高于对照组,说明经我们改造后的重组腺病毒 rAd-preS1 对肝细胞的亲和能力明显增强,而野生腺病毒 rAd 无此种倾向。因此体外细胞实验初步显示了嗜肝性重组腺病毒载体 rAd-preS1 对人肝细胞具有较强嗜向性。

综上所述,本研究成功构建重组腺病毒基因治疗载体 rAd-preS1 并获得高效稳定的表达,同时通过体外实验显示该载体对人正常肝细胞有相对较强嗜向性,且对其他非肝细胞的细胞无明显影响。

重组腺病毒载体 rAd-preS1 具有嗜肝特性,但同时又保留 rAd 多种优点,插入的 preS1 表达水平较高且安全性较好等,因此这对增强基因治疗疗效、减少基因治疗副作用等方面具有重要作用,为下一步研究靶向肝细胞基因治疗打下基础。

参 考 文 献

- [1] Fu Y, He J, Shi C, et al. Advances in helper-dependent adenoviral vector[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2009, 49(2): 147-152.
- [2] Park R J, Graham F L. A helper-dependent system for adenovirus vector production helps define a lower limit for efficient DNA packaging[J]. J Virol, 1997, 71(4): 3293-3298.
- [2] Schiedner G, Hertel S, Johnston M, et al. Variables affecting in vivo performance of high-capacity adenovirus vectors[J]. J Virol, 2002, 76(4): 1600-1609.
- [3] Dash S, Rao K V, Panda S K. Receptor for pre-S1(21-47) component of hepatitis B virus on the liver cell: role in virus cell interaction[J]. J Med Virol, 1992, 37(2): 116-121.
- [4] Bruss V, Gerhardt E, Vieluf K, et al. Functions of the large hepatitis B virus surface protein in viral particle morphogenesis[J]. Intervirology, 1996, 39(1-2): 23-31.
- [5] Xie Y, Zhai J, Deng Q, et al. Myristoylated PreS1-domain of the hepatitis B virus L-protein mediates specific binding to differentiated hepatocytes[J]. Hepatology, 2012. doi: 10.1002/hep.26181 [epub ahead of time].
- [6] Meier A, Mehrle S, Weiss T S, et al. Entry of hepatitis B virus: mechanism and new therapeutic target[J]. Pathol Biol (Paris), 2010, 58(4): 301-307.
- [7] Tyler M A, Ulasov I V, Borovjagin A, et al. Enhanced transduction of malignant glioma with a double targeted Ad5/3-RGD fiber-modified adenovirus[J]. Mol Cancer Ther, 2006, 5(9): 2408-2416.
- [8] Mahasreshni P J, Kataram M, Wu H, et al. Ovarian cancer targeted adenoviral-mediated mad-7/IL-24 gene therapy[J]. Gynecol Oncol, 2006, 100(3): 521-532.
- [9] Sung V M, Lai M M. Murine retroviral pseudotype virus containing hepatitis B virus large and small surface antigens confers specific tropism for primary human hepatocytes: a potential liver-specific targeting system[J]. J Virol, 2002, 76(2): 912-917.
- [10] Shi Y J, Gong J P, Liu C A. Construction of a targeting adenoviral vector carrying AFP promoter for expressing EGFP gene in AFP-producing hepatocarcinoma cell[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(2): 186-189.
- [11] 韩聚强, 胡大荣, 胡雪玲, 等. 以乙型肝炎病毒为载体的基因治疗研究[J]. 中华肝脏病杂志, 2003, 11(6): 344-346.
- [12] Han J Q, Hu D R, Hu X L, et al. Approach to transforming hepatitis B virus as a gene therapeutic vector[J]. Chin J Hepatol, 2003, 11(6): 344-346.
- [12] 张明满, 苟兴华, 李德华, 等. 嗜肝细胞腺相关病毒载体的构建[J]. 中华肝脏病杂志, 2009, 17(9): 707-708.
- [13] Zhang M M, Gou X H, Li D H, et al. Construction of a recombinant adenovirus hybrid vectors with the HBV capsid for gene therapy of liver diseases[J]. Chin J Hepatol, 2009, 17(9): 707-708.
- [13] Douglas J T. Adenovirus vector for gene therapy[J]. Mol Biotechnol, 2007, 36(1): 71-80.

(责任编辑:冉明会)