

肿瘤发病机制与治疗

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000039

DLC-1 基因重组慢病毒表达载体的构建及其在结直肠癌 SW480 细胞中的表达

王佳林, 王春毅, 刘 洪, 傅仲学

(重庆医科大学附属第一医院胃肠外科, 重庆 400016)

【摘要】目的:构建携带肝癌缺失基因-1(deleted in liver cancer-1, DLC-1)的重组慢病毒表达载体并实现 DLC-1 基因在结直肠癌(colorectal cancer, CRC)SW480 细胞中的过表达。**方法:**将 DLC-1 基因的靶序列与载体质粒 pcDNA3.1(+)-GFP 连接成重组质粒。重组质粒经双酶切法及基因测序验证构建正确后包装成慢病毒颗粒并计算病毒滴度。重组慢病毒感染 SW480 细胞,同时设置阴性对照组和空白对照组流式细胞仪(flow cytometry, FCM)检测感染率;real-time PCR 及 Western blot 检测 SW480 细胞中 DLC-1 基因表达水平。**结果:**重组质粒构建正确。重组慢病毒滴度为 1×10^9 TU/ml;对 SW480 细胞的感染率为 90%;DLC-1 mRNA 在重组慢病毒组细胞中过表达;重组慢病毒组 DLC-1 蛋白的表达水平显著高于阴性对照组($P=0.000$);阴性对照组与空白对照组比较差异无统计学意义($P=0.902$)。**结论:**成功构建了高滴度的 DLC-1 基因重组慢病毒,其携带的 DLC-1 基因能够在 CRC SW480 细胞中过表达,为后续研究 DLC-1 基因的表达在 CRC 的发生、发展中的作用奠定了实验基础。

【关键词】肝癌缺失基因-1;慢病毒;SW480 细胞;结直肠癌

【中图分类号】R735.3+4

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-01-09

Construction of recombinant lentiviral vectors expressing DLC-1 gene in colorectal carcinoma SW480 cells

Wang Jialin, Wang Chunyi, Liu Hong, Fu Zhongxue

(Department of Gastrointestinal Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To generate recombinant lentiviral vectors which can stably and effectively express DLC-1 gene in SW480 cells in colorectal cancer(CRC). **Methods:** Target sequence of DLC-1 was connected with plasmid pcDNA3.1(+)-GFP to construct recombinant plasmid pcDNA3.1(+)-GFP-DLC-1 and the integrity of pcDNA3.1(+)-GFP-DLC-1 was detected. Recombinant lentiviral vectors containing the recombined plasmids were packaged and the virus titer was calculated. The SW480 cells were infected by the recombinant lentiviral vectors and the transfection efficiency was detected. Negative control and blank control were set at the same time 10^9 . Then real-time PCR and Western blot were employed to evaluate expression level of DLC-1 gene by the recombinant lentiviral vectors in SW480 cells. **Results:** Recombinant lentiviral vectors were correctly constructed. The virus titer was 1×10^9 TU/ml and the transfection efficiency was 90%. Real-time PCR revealed overexpression of DLC-1 mRNA in the transfected SW480 cells. Western blot got the same result that the expression level of DLC-1 gene in the transfected SW480 cells was significantly higher than that of negative control group($P=0.000$) and difference between blank control group and negative control group was not significant($P=0.902$). **Conclusions:** Recombinant lentiviral vectors containing DLC-1 gene are successfully constructed and DLC-1 gene is stably and effectively overexpressed in the transfected SW480 cells, which lay foundation for further research on roles of DLC-1 gene in the development and progression of CRC.

【Key words】deleted in liver cancer-1; lentiviral vector; SW480 cell; colorectal carcinoma

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是最常见的

作者介绍:王佳林, Email: wjljohnson2013@163.com,

研究方向:胃肠道肿瘤的基因治疗。

通信作者:傅仲学, Email: fzx990521@sina.com。

基金项目:重庆市卫生局医学科学技术研究资助项目(编号:2010-2-048)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000039.html>

消化道恶性肿瘤之一,其发病率及死亡率呈逐年上升趋势。我国 CRC 的发病率在癌谱中的位置不断上升,从 2004 年的第 5 位上升至目前的第 3 位^[1]。CRC 的转移和复发是影响其预后的的主要因素。CRC 的侵袭转移可能与抑癌基因的表达异常有关。肝癌缺失基因-1(deleted in liver cancer-1, DLC-1)基因是

近年来研究得比较热门的一个新的候选抑癌基因。该基因的表达对 CRC 等多种肿瘤细胞均能起到抑制作用^[2-4],但具体的作用机制还未完全阐明。本实验通过构建 DLC-1 基因的重组慢病毒表达载体,并感染阴性表达 DLC-1 基因的 CRC SW480 细胞,使慢病毒导入的 DLC-1 基因在 SW480 细胞中过表达,为后续研究 DLC-1 基因的过表达对 CRC 细胞生物学行为的影响奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

SW480 细胞株、感受态细胞 Top10 及 293T 细胞由本实验室保存;胎牛血清 FBS(Gibco);DMEM 培养基(HyClone);Oligo DNA 由上海吉玛制药技术有限公司设计合成;dNTP、Pfu DNA 聚合酶(上海生工);Taq DNA 聚合酶(TAKARA);质粒 pcDNA 3.1-GFP、pHelper 1.0、pHelper 2.0、pUC 57、聚凝胺(上海吉玛);限制性内切酶、T4 DNA ligase、T4 DNA ligase buffer 和 DNA marker(MBI Fermentas);琼脂糖凝胶和 DNA 凝胶回收试剂盒(北京天根);Lentivirus-NC 病毒液(上海吉玛);胰蛋白酶-EDTA 溶液(Gibco);Trizol Reagent、Lipofectamine™ 2000(Invitrogen);96 孔板、6 孔板(Corning);质粒抽提试剂盒(QIAGEN);real-time PCR 试剂盒(上海吉玛);Western blot 试剂(Thermo);PVDF 膜(Millipore);DLC-1 单克隆抗体、GAPDH 单克隆抗体、GFP 抗体(美国 BD)及 HRP 标记抗兔二抗(美国 SantaCruz)。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒的构建及鉴定 根据 GeneBank 数据库(基因号 NM_006094.4)确定 DLC-1 基因靶序列,将 DLC-1 基因分成 3 个片段 A(1~900 bp)、B(843~2 437 bp)、C(2 381~3 276 bp),上、下游分别加上特异性酶切位点及保护碱基,由上海吉玛制药技术有限公司设计合成相应片段的 Oligo 序列。以 Oligo 序列为模板通过两步法 PCR 进行扩增,反应条件:95 ℃ 3 min;94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s 共 30 个循环,72 ℃ 延伸 5 min,退火形成双链 DNA,PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳纯化回收。3 个片段经 *Sma* I 酶切分别克隆到载体 pUC 57 中,挑选阳性克隆送公司测序验证。将片段 A 行 *Bam*HI 和 *Nco* I 酶切,片段 B 行 *Nco* I 和 *Eco*RI 酶切,片段 C 行 *Eco*RI 和 *Not* I 酶切,质粒 pcDNA 3.1(+)行 *Bam*HI 和 *Nco* I 酶切。电泳回收酶切片段,利用 T4 DNA 连接酶将 DLC-1 基因的 A、B、C 3 个片段及线性化的质粒 pcDNA3.1(+)按特定方向连接成重组质粒 pcDNA3.1(+)-GFP-DLC-1。重组质粒转化感受态细胞 Top10,细胞于氨苄西林平板培养 16 h。挑取阳性克隆的细胞振荡培养过夜(10 h),对质粒进行扩增,手工法提取质粒,行 *Bam*HI 和 *Not* I 双酶切鉴定。阳性克隆片

段送公司测序,结果与 GeneBank 数据库进行 BLAST 比对。

1.2.2 慢病毒包装及滴度的测定 将重组质粒[pcDNA 3.1(+)-GFP-DLC-1]和慢病毒包装质粒 pHelper 1.0、pHelper 2.0 分别进行高纯度无内毒素抽提,按 Invitrogen 公司 Lipofectamine™ 2000 使用说明共转染 293T 细胞,同时设置阴性对照组[含空载质粒 pcDNA3.1(+)-GFP]。转染后 8 h 更换为完全培养基,37 ℃ 和 5%CO₂ 条件下培养。转染 48 h 后,收集富含慢病毒颗粒的细胞上清液,20 000 r/min 超速离心 3 h 浓缩病毒,用 PVDF 膜过滤上清液,冰浴保存过夜(10 h)。在荧光显微镜下观察细胞绿色荧光的产生。将获得的重组慢病毒和阴性对照慢病毒通过荧光显微镜及流式细胞仪(flow cytometry,FCM)测定病毒滴度(TU/ml)。

1.2.3 慢病毒感染 SW480 细胞 SW480 细胞在 6 cm 培养皿中培养至 80%~90%融合时,按 1×10^5 个/孔的浓度随机接种 6 孔板,混匀后于 37 ℃,5%CO₂ 培养过夜。将慢病毒原液 100 μ l 用含 15% FBS 的 DMEM 培养液 10 倍稀释后加入终浓度为 5 μ g/ml 的聚凝胺。吸去 6 孔板中的培养液,每孔分别加入 1 ml 上述稀释的病毒液,同时设置阴性对照组[感染空载体慢病毒 pcDNA3.1(+)-GFP]和空白对照组(未感染慢病毒),于 37 ℃,5%CO₂ 培养 24 h。吸弃 6 孔板中稀释病毒液,每孔加入 1 ml 含 15%FBS 的新鲜 DMEM 培养基,于 37 ℃,5%CO₂ 继续培养 72 h,用荧光显微镜及 FCM 检测感染率。

1.2.4 Real-time PCR 检测 DLC-1 mRNA 的表达水平 病毒感染 96 h,分别取重组慢病毒组、阴性对照组及空白对照组的细胞,用 Trizol 一步法分别抽提各组细胞的总 RNA 进行 real-time PCR 检测。用 Oligo(dT)引物和随机引物进行逆转录,反应条件:75 ℃ 5 min,冰上骤冷,42 ℃ 45 min,85 ℃ 10 min,冰上骤冷。再以各组细胞的 cDNA 为模板进行扩增。DLC-1 基因上游引物:5'-CCGCCTGAGCATCTACGA-3',下游引物:5'-TTCTCCGACCACTGATTGACTA-3',扩增长度 155 bp;GAPDH 基因上游引物:5'-CATGAGAAGTATGACAACAGCCT-3',下游引物:5'-AGTCCTTCCACGATACC-AAAGT-3',扩增长度 113 bp。反应条件:95 ℃ 3 min 变性,95 ℃ 30 s,62 ℃ 40 s,72 ℃ 30 s,共 40 个循环,每个组均设置 3 个随机复孔。同时,取 1 ml cDNA 逐倍稀释,在上述相同的引物及反应条件下分别进行扩增。反应结束后得到相应的 Ct 值,分别计算 DLC-1 及 GAPDH 基因扩增效率,若扩增效率一致,运用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法对各组细胞 DLC-1 mRNA 的表达水平进行相对定量。

1.2.5 Western blot 检测 SW480 细胞中 DLC-1 基因相关蛋白的表达水平 病毒感染 96 h,分别收集各组细胞,加入裂解液进行蛋白抽提,再用 BCA 法进行蛋白定量,每组均设置 3 个随机重复。从每个样品中抽取 20 μ g 分别进行凝胶电泳,经转膜、封闭一抗(1:1 000)后,4 ℃ 孵育过夜(内参 GAPDH 抗体),洗膜,室温下二抗(1:1 000)孵育 1 h,洗膜,用 Super-Signal West Pico Chemiluminescent Substrates 进行化学发光检测,并对 X 线片曝光。经显影定影处理后,胶片用扫描仪扫

描,并使用 Gel-Pro analyzer 软件分析各条带灰度值,进行半定量比较分析,并且均采用自身灰度值校正,将各组细胞 DLC-1 的灰度与对应管家基因 GAPDH 灰度比值作为 DLC-1 基因的相对表达量。

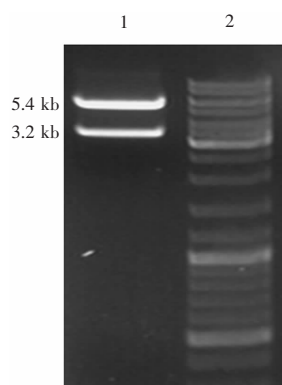
1.3 统计学处理

采用 SPSS 18.0 数据处理软件进行多组间单因素方差分析,实验计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 重组质粒双酶切鉴定及测序验证

DLC-1 基因的 A、B、C 3 个片段经 *Sma* I 酶切分别克隆到载体 pUC 57 中,阳性克隆经公司测序验证完全正确。将重组质粒 pcDNA3.1(+)-GFP-DLC-1 经 *Bam*H I 和 *Not* I 双酶切后,行 1% 琼脂糖凝胶电泳,得到了 5.4 kb 的 pcDNA3.1(+)-GFP 空载体条带及 3.2 kb 的 DLC-1 基因条带(图 1),与预期的条带大小一致,故初步判定重组质粒构建正确。测序结果经 BLAST 比对证实重组质粒中 DLC-1 基因序列与 GenBank 数据库 NM_006094.4 序列完全一致(图 2)。故判定重组质粒载体 pcDNA3.1(+)-GFP-DLC-1 构建正确。



1. 重组质粒双酶切片段; 2. DNA marker

图 1 重组质粒的双酶切电泳图

Fig.1 Double restriction enzyme digestion electrophoresis of recombinant plasmid

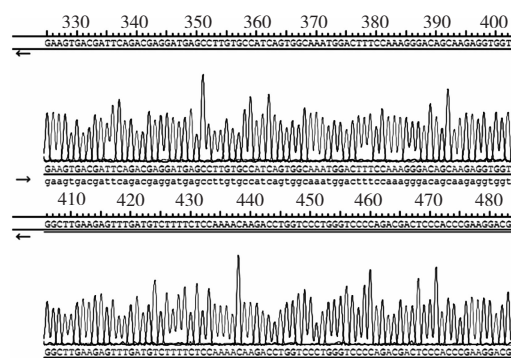
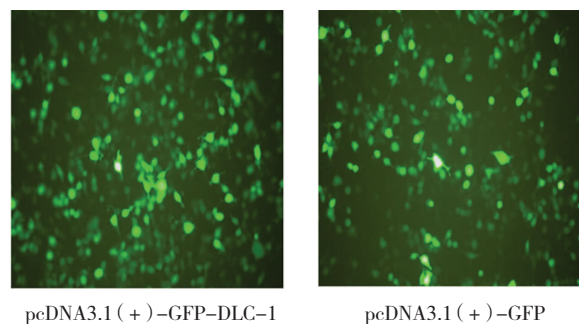


图 2 重组质粒部分测序图

Fig.2 A part of the sequence map of recombinant plasmid

2.2 慢病毒的包装及滴度测定

慢病毒载体的 3 质粒共同转染 293T 细胞包装成慢病毒颗粒,在荧光显微镜下观察到 293T 细胞中绿色荧光蛋白的表达(图 3)。经测定, DLC-1 重组慢病毒的滴度为 1×10^9 TU/ml, 阴性对照慢病毒的滴度为 1×10^0 TU/ml。



pcDNA3.1(+)-GFP-DLC-1 pcDNA3.1(+)-GFP

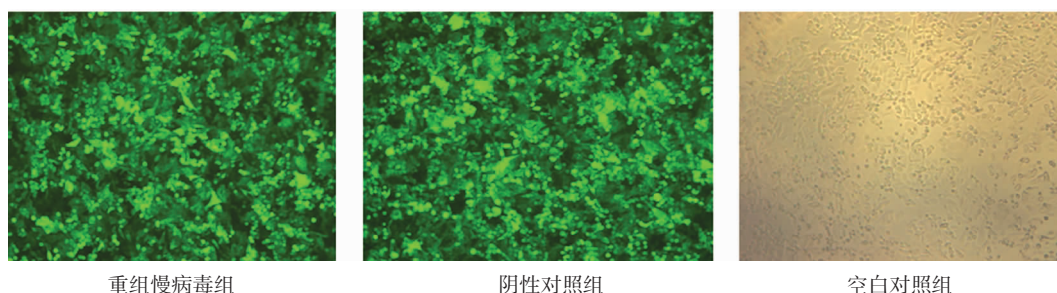
图 3 293T 细胞在荧光显微镜下发出的绿色荧光 (100 ×)

Fig. 3 293T cells emitting green fluorescence under fluorescence microscope (100 ×)

2.3 慢病毒的感染率

用所得的重组载体慢病毒颗粒以及空载慢病毒颗粒当感染复数值为 1 时分别感染 SW480 细胞,感染 72 h 后在荧光显微镜下观察到 SW480 细胞的绿色荧光蛋白的表达(图 4),FCM 测得慢病毒感染 SW480 细胞的感染率为 90%。

2.4 Real-time PCR 检测 SW480 细胞中 DLC-1 mRNA 的表达通过 real-time PCR 检测得到各个基因的 Ct 值。目的基



重组慢病毒组

阴性对照组

空白对照组

图 4 荧光显微镜下 SW480 细胞发出的绿色荧光 (100 ×)

Fig.4 Green fluorescence of SW480 cells under fluorescence microscope (100 ×)

表 1 SW480 细胞中 DLC-1 mRNA 相对 GAPDH 基因的表达

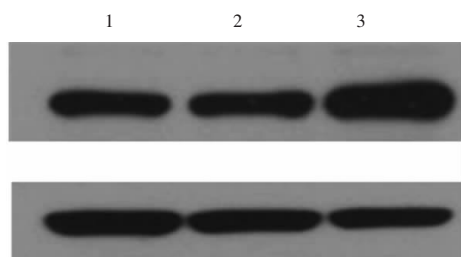
Tab.1 Expression of DLC-1 mRNA relative to GAPDH in SW480 cells

组别	基因 GAPDH				基因 DLC-1				ΔCt	$\Delta \Delta Ct$	$2^{-\Delta \Delta Ct}$
	Ct 1	Ct 2	Ct 3	平均 Ct 值	Ct 1	Ct 2	Ct 3	平均 Ct 值			
阴性对照组	18.11	18.13	18.12	18.12	26.78	26.82	26.79	26.80	8.68	0.00	1.00
空白对照组	18.80	18.79	18.80	18.80	27.83	27.78	27.80	27.80	9.01	0.33	0.80
重组慢病毒组	18.94	18.99	18.99	18.97	23.35	23.46	23.50	23.44	4.46	-4.54	23.32

因 DLC-1 与内参基因 GAPDH 的扩增效率一致,可运用 $2^{-\Delta \Delta Ct}$ 法计算各组细胞 DLC-1 mRNA 的相对表达水平。以阴性对照组为标准化样品,其余组 $2^{-\Delta \Delta Ct}$ 值为该组 DLC-1 基因的表达量相对于标准组基因表达量的倍数。经计算,阴性对照组 DLC-1 基因的相对表达量为 1.00,空白对照组为 0.80,重组慢病毒组为 23.32(表 1)。实验结果表明,DLC-1 基因在重组慢病毒中获得了过表达。

2.5 Western blot 检测 DLC-1 蛋白的表达

病毒感染 96 h 后收集各组细胞行 Western blot 检测,胶片行显影定影处理(图 5),再用软件进行灰度半定量分析。测得阴性对照组 DLC-1 蛋白的相对表达量为 0.89 ± 0.06 ,空白对照组为 0.91 ± 0.04 ,重组慢病毒组为 2.19 ± 0.16 (图 6)。单因素方差分析结果显示($F=162.803, P=0.000$),重组慢病毒组 DLC-1 蛋白的表达水平明显高于阴性对照组和空白对照组($P=0.000$);空白对照组与阴性对照组比较差异无统计学意义($P=0.902$)。



1. 阴性对照组;2. 空白对照组;3. 重组慢病毒组

图 5 Western blot 检测 DLC-1 蛋白的表达

Fig.5 Expression of DLC-1 protein in SW480 cells

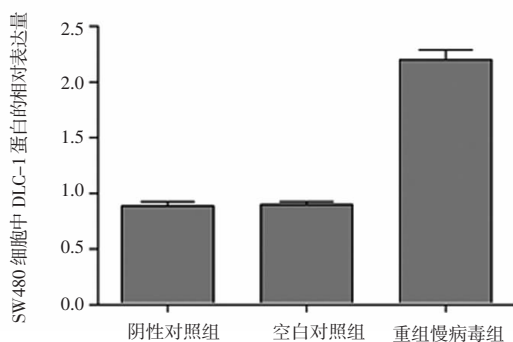


图 6 SW480 细胞中 DLC-1 蛋白的相对表达量

Fig.6 Expression of DLC-1 protein relative to GAPDH in SW480 cells

3 讨论

CRC 的发生涉及多个癌基因及抑癌基因的突变(如 APC、K-ras、P53 等)及多个细胞信号通路(如 Wnt/ β -catenin 信号通路)的共同作用,这些关键基因的异常表达及信号通路的异常激活导致肠道上皮细胞的异常增殖,由起初的正常细胞逐步发展为良性腺瘤并最终转变为恶性肿瘤^[5]。抑癌基因是一类调控细胞增殖及潜在抑制肿瘤形成的基因。阐明肿瘤抑癌基因的作用机制有望找到肿瘤基因治疗的突破口。DLC-1 是一种新近发现的抑癌基因。它是在人肝癌细胞中一个经常缺失的基因,后来的研究发现它在结肠癌等多种肿瘤中均存在低表达或表达缺失^[6]。DLC-1 与肿瘤的发生发展密切相关,因而受到了广泛的关注。目前的研究认为它有 3 个重要的功能结构域:RhoGAP(Rho GTPase activating protein)、START(steroidogenic acute regulatory related lipid transfer domains)和 SAM(sterile alpha motif)。DLC-1 基因的生物活性主要由 RhoGAP 结构域执行,其中关键作用因子 Rho GTPase 对于调控细胞的增殖、细胞骨架的重构、细胞的极性和细胞的迁移等起到了关键的作用,一旦发生异常就可能导致细胞发生转变^[7],DLC-1 在肿瘤形成的过程中可能起到了十分重要的作用。有研究表明,DLC-1 的表达水平与肿瘤的恶性程度呈负相关^[8],它在癌组织中的表达水平低于癌旁组织及正常组织^[9],甲基化可能是导致其低表达的原因之一^[10]。另有研究表明,DLC-1 在 CRC SW480 细胞中呈阴性表达,通过药物使 DLC-1 重新表达可以影响 SW480 细胞的增殖能力和侵袭能力^[11],这为 DLC-1 基因有望成为 CRC 基因治疗的靶点提供了实验依据。目前对于 DLC-1 的研究已陆续展开,已经比较明确的是它对 CRC 能够发挥抑制作用。然而其发挥抑癌作用的分子机制尚未完全阐明,故有必要对其展开更深入的

研究。本实验利用基因转移技术将目的基因 DLC-1 导入阴性表达 DLC-1 的 CRC SW480 细胞,获得 DLC-1 的过表达,从而为进一步研究 DLC-1 对 CRC 细胞生物学行为的影响构建实验技术平台。

基因转移技术是基因治疗的核心技术,即通过构建基因转移载体将目的基因导入靶细胞,实现目的基因的表达。近年来,逆转录病毒载体被广泛应用于基因转移技术中^[12]。其中,慢病毒载体是逆转录病毒载体中应用较广的一种。它是在 HIV 的基础上发展而来的基因转移载体,具有操作简便、感染能力强、安全性高及能够稳定表达目的基因的特点,有望成为基因治疗的理想载体^[13]。本实验使用 pcDNA3.1(+)-GFP 真核表达载体、慢病毒包装质粒 pHelper 1.0 和 pHelper 2.0 3 质粒转染系统共转染 293T 细胞,进行慢病毒的包装。其中 pHelper 1.0 质粒所含 HIV 病毒的 gag 基因能够编码病毒主要的结构蛋白, pol 基因编码病毒特异性的酶, rev 基因编码 gag 和 pol 基因表达的调节因子; pHelper 2.0 质粒所含单纯疱疹病毒来源的 VSV-G 基因则提供病毒包装所需的包膜蛋白^[14-15]。实验结果证实,通过 3 质粒慢病毒转染系统进行病毒的包装,能够获得高滴度的 DLC-1 重组慢病毒载体,再用高滴度的慢病毒感染 SW480 细胞获得了相当高的感染率,充分满足了下游实验的需要。Real-time PCR 及 Western blot 检测结果显示,重组慢病毒组 DLC-1 基因的表达水平显著高于空白对照组及阴性对照组,且空白对照组和阴性对照组 DLC-1 基因的表达水平无显著差异,表明重组慢病毒导入的 DLC-1 基因能够在 CRC 细胞中过表达,而慢病毒本身不会影响亲本 SW480 细胞中 DLC-1 基因的表达。

综上所述, DLC-1 基因是 CRC 的一个新的候选抑癌基因,有望成为 CRC 基因治疗的新靶点,故对其进行研究具有十分重要的意义。本实验成功构建的 DLC-1 重组慢病毒载体能够高效率地感染 CRC SW480 细胞,并能在 SW480 细胞中过表达 DLC-1 mRNA 及蛋白质,建立了稳定过表达 DLC-1 的 CRC 细胞系,为后续研究 DLC-1 过表达对 CRC 细胞生物学行为的影响及其与相关细胞信号通路的关系

奠定了实验基础。

参 考 文 献

- [1] 赵平,陈万青.2010 中国肿瘤登记年报[M].北京:军事医学科学出版社,2011:10-28.
- [2] Wu PP, Jin YL, Shang YF, et al. Restoration of DLC1 gene inhibits proliferation and migration of human colon cancer HT29 cells[J]. Ann Clin Lab Sci, 2009, 39(3): 263-269.
- [3] Feng M, Huang B, Du Z, et al. DLC-1 as a modulator of proliferation, apoptosis and migration in Burkitt's lymphoma cells[J]. Mol Bio Rep, 2011, 38(3): 1915-1920.
- [4] Liu H, Shi H, Hao Y, et al. Effect of FAK, DLC-1 gene expression on OVCAR-3 proliferation[J]. Mol Bio Rep, 2012, 39(12): 10665-10670.
- [5] Kanwar SS, Poolla A, Majumdar AP. Regulation of colon cancer recurrence and development of therapeutic strategies[J]. World J Gastrointest Pathophysiol, 2012, 3(1): 1-9.
- [6] Durkin ME, Yuan BZ, Zhou X, et al. DLC-1: a Rho GTPase-activating protein and tumour suppressor[J]. J Cell Mol Med, 2007, 11(5): 1185-1207.
- [7] Lukasik D, Wilczek E, Wasitynski A, et al. Deleted in liver cancer protein family in human malignancies (review)[J]. Oncol Lett, 2011, 2(5): 763-768.
- [8] Guan CN, Zhang PW, Lou HQ, et al. DLC-1 expression levels in breast cancer assessed by qRT-PCR are negatively associated with malignancy[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2012, 13(4): 1231-1233.
- [9] 汤华, 杨晓俊, 赵铁, 等. DLC-1 蛋白在胃癌中的表达及其临床病理意义[J]. 安徽医学, 2010, 31(11): 1328-1331.
- [10] 马小娟, 覃君慧, 信波, 等. DLC-1 基因在 MCF-7 人乳腺癌细胞系中低表达的机制探究[J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(7): 1231-1234.
- [11] 田小强, 金月玲, 商延芳, 等. 抑癌基因 DLC-1 在结肠癌细胞 sw480 中表达的研究[J]. 现代生物学进展, 2007, 7(2): 169-171.
- [12] Yi Y, Noh MJ, Lee KH. Current advances in retroviral gene therapy[J]. Curr Gene Ther, 2011, 11(3): 218-228.
- [13] Escors D, Breckpot K. Lentiviral vectors in gene therapy: their current status and future potential[J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2010, 58(2): 107-119.
- [14] Sena-Esteves M, Tebbets JC, Steffens S, et al. Optimized large scale production of high titer lentivirus vector pseudo types[J]. J Virol Methods, 2004, 122(2): 131-139.
- [15] Reiser J. Production and concentration of pseudo typed HIV-1 based gene transfer vectors[J]. Gene Ther, 2000, 7(11): 910-913.

(责任编辑:唐秋姗)