文章编号:1000-5404(2005)02-0091-04

论著

质粒表达型 siRNA 对 SARS-CoV 复制与感染干扰的初步研究

李 阳[1],倪 兵[1],石辛甫[2],王希良[2],何仰东[1],肖 宇[1],姜 曼[1],黎万玲[1],吴玉章[1] ([1]第三军医大学全军免疫学研究所,重庆 400038;[2]军事医学科学院五所三室,北京 100071)

提 要:目的 构建针对 SARS-CoV 的特异性 siRNA 质粒,利用 RNA 干扰技术抑制该病毒复制与感染。**方法** 根据 SARS-CoV 的全长基因序列,以 4 个不同的部位为靶点,分别设计、合成含有 19 nt 干扰序列的一段寡核苷酸,将两两互补的寡核苷酸经退火后所形成的序列克隆到 pSilencer 3.1-H1 载体中,构建表达 siRNA 的质粒。采用脂质体法将质粒转染 Vero E6 细胞,经潮霉素抗性筛选后,再对稳定表达的细胞进行细胞病变、病毒空斑形成和 MTT 实验,以观察干扰效应。**结果** 对所构建的质粒分别测序,确定其含有 siRNA 的序列与预期的特异性干扰序列一致。用不同浓度的 SARS-CoV 感染转染质粒后的细胞,与阴性对照相比,其细胞病变减轻、活细胞显著增加,病毒空斑明显减少。**结论** 利用 RNA 干扰能有效的抑制 SARS-CoV 在细胞中的复制,并对细胞有保护作用,为预防、治疗 SARS 提供了新的思路和方法。

关键词: SARS 病毒;RNA 干扰;小干扰 RNA;基因治疗
中图法分类号: R373.1; R394-33; R394.3 **文献标识码:** A

Inhibition of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus replication and infection by plasmid-mediated siRNA

LI Yang[1], NI Bing[1], SHI Xin-fu[2], WANG Xi-liang[2], HE Yang-dong[1], XIAO Yu[1], JIANG Man[1], LI Wan-lin[1], WU Yu-zhang[1] (Institute of Immunology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]Department 3, Institute 5, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

Abstract: Objective To inhibit severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARS-CoV) replication by constructing specific small interfering RNA (siRNA) vectors which can induce RNA interference (RNAi). **Methods** The hairpin siRNA template oligonucleotides that target SARS-CoV were designed and synthesized according to the whole genomic sequence of this virus. The products of annealing the hairpin siRNA template oligonucleotides respectively were cloned into vector pSilencer 3.1-H1 to construct the plasmids expressing siRNA. After these plasmids were transferred into Vero E6 cells by DOTAP reagent, the stable cells expressing short hairpin siRNA were obtained by using hygromycin selection. Then CPE and MTT experiments and plaque reduction array were conducted with above cells. **Results** The sequencing results indicated that the sequences cloned into vectors were identical to the expected. Combined with the negative control, the number of alive cells transfected plasmids expressing siRNA increased dramatically under SARS-CoV attack. **Conclusion** The inhibitive effect of RNAi on SARS-CoV replication may provide us a new strategy to prevent and treat SARS.

Key words: SARS-CoV; RNA interference; small interfering RNA; gene therapy

严重急性呼吸综合征(severe acute respiratory syndrome, SARS)又称传染性非典型肺炎,是一种严重危害公共卫生的疾病。现已明确,一种人类从未发现过的新型冠状病毒是导致 SARS 的病原体,WHO 将其命名为 SARS 冠状病毒(SARS Coronavirus, SARS-CoV)[1,2]。由于该病来势凶猛、传染性强、病死率高,给人们心理造成了巨大阴影和恐慌,给社会带来沉重负担。虽然在全球范围内已完全控制了该病,但由于对其认识不深,并不能排除其再度爆发的可能性。因此很有必要继续深入研究和探索新的防治 SARS 的方法。

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是一种由双链 RNA(double stranded ribonucleic acid, dsRNA)介导的转录后基因沉默机制,在从线虫到人类细胞中都广泛存在该机制。当外源导入的 dsRNA 被 Dicer 酶切割成 21 ~ 23 nt 的小分子干扰 RNAs(small interfering RNA, siRNAs)后,siRNAs 就与体内其他成分聚合形成 RNA 诱导的基因沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC),然后活化的 RISC 通过由 siRNA 决定的碱

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(2003CB514108)
Supported by the National Key Basic Research Development and Plan of China ("973" Projects) (2003CB514108)
作者简介:李 阳(1976-),男,安徽省巢湖市人,硕士研究生,技师,主要从事分子生物学和肿瘤免疫方面的研究。电话:(023)68752238-619
通讯作者:吴玉章,电话:(023)68752680
收稿日期:2004-07-03;修回日期:2004-11-11

基配对原理来切割具有同源序列的转录体，最终导致特异的基因沉默效应。目前，RNAi 技术发展十分迅速，不仅已成为研究基因功能的有力工具，还正在被用于人类疾病基因治疗的实验研究中。尤其是在由病毒介导的感染病研究领域，利用 RNAi 技术来特异的抑制 HIV、HCV、HBV 和流感病毒的复制及蛋白表达都取得了初步成功[3~7]。与 HCV 相似的是，SARS-CoV 也为正链的单链 RNA 病毒，这提示，RNAi 很有可能对 SARS-CoV也同样有效。本研究拟选择 SARS-CoV 全长基因序列上的 4 个部位为干扰靶点，构建分别表达小发夹结构 RNAs 的 4 种 siRNA 质粒，转染 Vero E6 细胞后，用不同浓度活病毒感染这些细胞，以观察 RNAi 对该病毒抑制的效应，为其作为一种潜在的基因治疗手段奠定初步的实验基础。

1 材料与方法

1.1 细胞株、培养基、质粒和 SARS 病毒

Vero E6 细胞购自 ATCC；DMEM 培养基和胎牛血清购自 GIBCO 公司；表达小发夹结构 RNAs 的 siRNA 质粒 pSilencer 3.1-H1购自 Ambion 公司，该质粒为可直接用于连接的线性化载体，5′和 3′端分别为 *Hind*Ⅲ和 *Bam*HⅠ酶切位点；SARS 病毒株是 BJ-01 株，由军事医学科学院微生物流行病研究所病毒室提供，所有与活病毒相关的实验都在生物安全三级实验室进行，符合国家有关规定。

1.2 试剂和试剂盒

T4 连接酶及限制性内切酶 *Hind*Ⅲ、*Bam*HⅠ购自 Takara 公司；High Pure 质粒小量抽提试剂盒、脂质体 DOTAP 购自 Roche 公司；氨苄青霉素、潮霉素购自上海生工公司；MTT 试剂购自 Sigma 公司；L-谷胺酰胺中性红染液及琼脂糖粉购自 GIBCO 公司。

1.3 设计、合成 siRNA 序列

靶序列的设计参见文献[8]。根据 pSilencer 3.1-H1 载体的使用要求，针对每一个靶序列应设计两条互补的、长 55~60 个碱基的寡核苷酸，这两条寡核苷酸应包含该靶序列正义链、形成发夹结构的序列、靶序列反义链及终止序列。最终选择合成以下 8 条链：①1 号链：5′-GATCCCG***CAGCCCTATGTGTTCATTA*** ttcaagaga**TAATGAACACATAGGGCTG** *ttttt*GGAAA-3′；②2 号链：5′-AGCTTTTCCAAAAAACAGCCCTATGTGTTCATTAtctcttgaa TAATGAACACATAGGGCTGCGG-3′；③3 号链：5′-GATCCCG***CTCACTCGTGAGCTCAATG*** ttcaagaga**CATTGAGCTCACGAGTGAG** *ttttt*GGAAA-3′；④4 号链：5′-AGCTT TTCCAAAAAACTCACTCGTGAGCTCAATGtctcttgaaCATTGAGCTCACGAGTGAGCGG-3′；⑤5 号链：5′-GATCCCG***TGTGTACAACTCCACAATG*** ttcaagaga**CATTGTGGAGTTGTACACA** *ttttt*GGAAA-3′；⑥6 号链：5′-AGCTT TTCCAAAAAATGTGTACAACTCCACAATGtctcttgaaCATTGTGGAGTTGTACACACGG-3′；⑦7 号链：5′-GATCCC***GAGGCATACTATGTCTAAC*** ttcaagaga**GTTAGACATAGTATGCCTC** *ttttt*GGAAA-3′；⑧8 号链：5′-AGCTTTTCCAAAAAAGAGGCATACTATGTCTAACtctcttgaaGTTAGACATAGTATGCCTCGG-3′。上述带下划线部分序列在单号链中为 *Bam*HⅠ酶切位点，在双号链中为 *Hind*Ⅲ酶切位点；小写部分是形成发夹结构的序列；单号链中黑体兼斜体部分是靶序列正义链，黑体部分是靶序列反义链，小写兼斜体部分是终止序列。其中 2、4、6、8 号分别是 1、3、5、7 号的互补链，经退火处理即可得到 4 条含有不同的 siRNA 序列的 DNA 片段（互补后两端正好暴露出酶切位点）。将 1 和 2、3 和 4、5 和 6、7 和 8 号链形成的双链片段分别编为Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ号。

1.4 构建表达小发夹结构 RNAs 的质粒

将上述Ⅰ~Ⅳ号双链片段分别与线性化的 pSilencer 3.1-H1载体混合，加入 T4 连接酶，16 ℃反应 16 h。用连接反应物转化感受态 DH5α，氨苄青霉素平板筛选。挑取阳性单克隆进行扩增，抽提重组质粒备用。质粒编号与插入的双链片段编号相对应。

1.5 重组质粒的鉴定

Ⅰ~Ⅳ号重组质粒分别经 *Bam*HⅠ/*Hind*Ⅲ双酶切，然后在 12%的非变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳鉴定目的片段是否分别插入。鉴定正确的克隆送上海申友公司测序。

1.6 转染细胞和筛选稳定表达细胞

按 DOTAP 使用说明书，将Ⅰ~Ⅳ号重组质粒分别转染至 Vero E6 细胞，并将细胞按相应号数标记，48 h 后加入潮霉素进行筛选，其浓度为 400 μg/ml。10 d 后筛选到稳定的具有潮霉素抗性的细胞。

1.7 细胞病变效应（cytopathic effect，CPE）

将筛选好的Ⅰ~Ⅳ号细胞分别接种于 4 个 96 孔板，每板另各设 4 个对照孔接种未转染质粒的细胞，把含 SARS 活病毒的原液按 10^{-1}~10^{-10}进行 10 倍系列稀释，然后将不同浓度的稀释液分别加入各板相应的孔中（设 4 个复孔），混匀，继续培养。分别于 24、48、72 h 观察细胞病变效应，病变范围 < 25%记为 +，25%~50%为 ++，51%~75%为 +++，> 75%为 ++++。

1.8 病毒空斑实验

将筛选好的Ⅰ~Ⅳ号细胞及未转染质粒细胞分别接种于 24 孔板培养，每种细胞设 3 个平行孔。48 h 后细胞形成单层，除 3 孔作阴性对照的未转染质粒细胞，其余每孔细胞中加入稀释度为 2×10^{-5}的 SARS 活病毒，37 ℃吸附 2 h，弃病毒液，覆盖 1.5%琼脂糖营养培养基，待凝固后倒置培养。次日（72 h 后）以中性红染色，记录空斑数。

1.9 MTT 实验

将筛选好的Ⅰ~Ⅳ号细胞和未转染质粒细胞分别接种于 5 个 96 孔板，每孔 10^4 个细胞，每板另各设 7 个对照孔（加未转染质粒细胞）和 3 个空白孔（不加细胞）。把含 SARS 活病毒的原液按 10^{-1}~10^{-11}进行 10 倍系列稀释，然后将不同浓度的稀释液分别加入各板相应的孔中（对照孔不加），混匀，每一稀释度重复 4 孔，放入 CO_2 孵箱中培养。3 d 后取出各板，弃上清液，加培养液 100 μl，MTT 液（5 mg/ml）10 μl，继续孵育 4 h 后，弃上清液，加二甲亚砜 100 μl/孔，振摇 10 min，于酶标仪上，波长 570 nm 下，空白调零，测各孔吸光度值（D_{570}）。

1.10 统计学方法

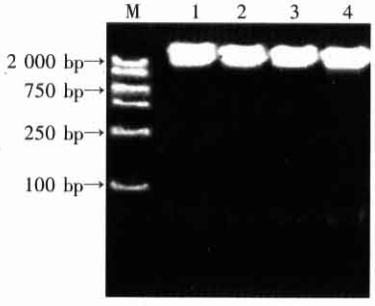
数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，应用 SPSS 统计软件对所得数据进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 siRNA 质粒的构建及目的片段的测序结果

由于线性化的 pSilencer 3.1-H1 载体和退火所得的Ⅰ~Ⅳ

号双链 DNA 片段两端均已暴露出酶切位点,所以将两者直接经 T4 连接酶连接,转化 DH5α,在 4 个氨苄青霉素平板上培养过夜后,每个板可见形态大小均一的 20 余个阳性单克隆菌落;而对照平板上未见任何菌落生长。分别挑取 1 ~ 4 板上的菌落,扩增后用 High Pure 质粒抽提试剂盒提取质粒,用 *Bam*H Ⅰ/*Hind* Ⅲ进行双酶切分析,筛选出分别含 Ⅰ ~ Ⅳ号目的片段的阳性克隆菌株(图 1)。进一步测序鉴定,其结果显示退火所得的 Ⅰ ~ Ⅳ号双链 DNA 片段序列与我们设计的序列完全一致,并成功克隆到所需载体相应位置。



M: DL2000 DNA marker; 1 - 4: Recombinant plasmids from No. Ⅰ to No. Ⅳ digested with *Bam*H Ⅰ and *Hind* Ⅲ respectively

图 1　Ⅰ ~ Ⅳ号重组 siRNA 质粒的双酶切鉴定电泳图

Fig 1　Electrophoretic analysis of double enzymatic digestion of plasmids expressing siRNA from No. Ⅰ to No. Ⅳ

2.2　转染 siRNA 质粒细胞的病变效应

如表 1 ~ 3 所示,作为对照的未转染质粒的 Vero E6 细胞 24 h后在病毒滴度 10^{-1} ~ 10^{-4}即出现 CPE,72 h 后所有稀释梯度浓度的病毒全部使其出现 CPE,而且 CPE 程度非常严重。而 Ⅰ ~ Ⅳ号细胞 24 h 后均未出现 CPE;48 h 后在高浓度病毒情况下出现程度不同的 CPE;72 h 后,Ⅰ号细胞在病毒滴度 10^{-7}时仅有极微弱 CPE,Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ号细胞 CPE 持续到病毒滴度 10^{-4}。由此可见,Ⅰ ~ Ⅳ号 siRNA 质粒均对病毒有抑制效应,能保护细胞,但效应强度有差异。

表 1　24 h 后细胞病变效应

Tab 1　Cytopathic effect of cells at 24 h after virus attack

	Dilution ratio of virus									
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
Cytopathic effect										
Control Vero E6 cells	++++	+++	++	+	-	-	-	-	-	-
No. Ⅰ Vero E6 cells	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
No. Ⅱ Vero E6 cells	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
No. Ⅲ Vero E6 cells	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
No. Ⅳ Vero E6 cells	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

表 2　48 h 后细胞病变效应

Tab 2　Cytopathic effect of cells at 48 h after virus attack

	Dilution ratio of virus									
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
Cytopathic effect										
Control Vero E6 cells	++++	++++	++++	+++	++	+	+	+	-	-
No. Ⅰ Vero E6 cells	+++	++	±	-	-	-	-	-	-	-
No. Ⅱ Vero E6 cells	+++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
No. Ⅲ Vero E6 cells	+++	++	±	-	-	-	-	-	-	-
No. Ⅳ Vero E6 cells	++	+	±	-	-	-	-	-	-	-

表 3　72 h 后细胞病变效应

Tab 3　Cytopathic effect of cells at 72 h after virus attack

	Dilution ratio of virus									
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
Cytopathic effect										
Control Vero E6 cells	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++
No. Ⅰ Vero E6 cells	++++	++++	++++	+++	++	+	±	-	-	-
No. Ⅱ Vero E6 cells	++++	+++	++	+	-	-	-	-	-	-
No. Ⅲ Vero E6 cells	++++	+++	++	+	-	-	-	-	-	-
No. Ⅳ Vero E6 cells	++++	+++	++	+	-	-	-	-	-	-

2.3　空斑实验

未转染质粒的 Vero E6 细胞不加病毒液无空斑形成,加入 2×10^{-5}滴度病毒的该细胞形成 18 个空斑;Ⅰ ~ Ⅳ号细胞形成的空斑数分为:7 ± 2.35、5.33 ± 1.80、3.66 ± 1.52、3.3 ± 1.15 个(图请见参考文献[8])。与对照相比,空斑数都明显减少,说明从Ⅰ ~ Ⅳ号细胞内释放出的病毒数量显著下降($P < 0.01$),病毒复制在这些细胞内受到了有效干扰。

2.4　MTT 实验

随着病毒滴度不断下降,各孔 D_{570}值也不断升高,但在相同条件下,Ⅰ ~ Ⅳ号细胞相对于未转染质粒的 Vero E6 细胞其 D_{570}值都高。根据公式:细胞存活率 = 加病毒液细胞孔吸光度值/对照细胞孔吸光度值,计算出各孔细胞存活率,并绘制曲线图(图 2)。从图可以清楚的看到,Ⅰ ~ Ⅳ号细胞存活率都明显高于对照细胞($P < 0.01$),提示病毒在这些细胞中受到不同程度抑制。

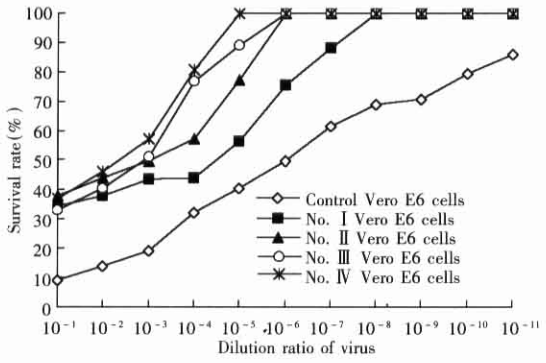


图 2　不同细胞的存活率曲线图

Fig 2　Survival curves of different cells

3　讨论

SARS-CoV 基因组全部序列已经确定。该病毒为正链的单链 RNA 病毒,复制时不经过 DNA 中间体,使用标准密码子,基因组全长 29 727 bp,含有完整的 5′末端序列、编码序列和 3′末端序列;其基因编码区的组成结构与其它冠状病毒类似,包括 11 个开放阅读框(ORFs),总长度为 28 550 bp,占整个基因组的 96%;ORFs 分别编码了病毒的功能、结构和非结构蛋白。不同来源的 SARS 病毒株的基因序列基本一致,提示该病毒基因相当稳定[9,10],各地的 SARS 病原体流行病学具有一致性。以上 SARS-CoV 的特点都有利于利用 RNAi 来对细胞内病毒进行特异性抑制和干扰,因此我

们设计了针对SARS-CoV基因的4个干扰靶序列，它们在病毒全长基因上的位置如下：①Ⅰ号：445-463（针对leader基因）；②Ⅱ号：766-784（针对leader基因）；③Ⅲ号：11851-11869（针对nsp4基因）；④Ⅳ号：13574-13592（针对RdRp基因）。选择这些序列的原则是其必须紧接位于连续的2个“A”碱基下，GC含量在30%～50%，不能含有连续4个或以上的“T”碱基，并确保其序列与人类无关，这样才有可能提高RNAi的最终效应。同时，由于质粒表达型siRNA产生的干扰作用比化学合成的siRNA更持久、有效[11]，所以我们将表达小发夹结构RNAs的序列置于载体pSilencer 3.1的H1启动子下，构建质粒表达型siRNA。

结合细胞病变效应、空斑形成和MTT实验的结果，可以看出分别转染4种siRNA质粒的细胞都对SARS病毒有抵抗作用，证明这些质粒在细胞内都有效表达出小发夹结构RNAs，后者被加工处理成siRNA样分子，诱导产生针对SARS-CoV基因的RNAi效应，导致病毒复制和蛋白表达受到抑制，对细胞形成了保护作用。Ⅰ～Ⅳ号质粒对SARS病毒的抑制率分别为61.1%、70.4%、79.6%和81.6%，这种欲干扰的靶序列在靶基因中因不同部位而产生不同效率的现象称作位置效应[12]。因此同为针对Leader蛋白基因的Ⅰ号和Ⅱ号干扰靶序列产生了较大差别的干扰效率。以往在对其他冠状病毒的研究中就发现Leader对病毒的包装和不连续复制都有重要作用，所以干扰它的表达应该能取得比较好的病毒抑制效果，我们的结果也证实了这一点。尽管nsp4的功能尚不清楚，但针对其进行干扰效果也不错。RdRp是RNA依赖的RNA聚合酶，对病毒有至关重要的作用，然而它可能会与一些蛋白结合后遮盖住部分靶序列，所以针对它的干扰效率会降低。虽然4条所选siRNA靶序列的总体干扰效果不错，但从理论上应该有25%的几率选到一条干扰效率达到90%以上的siRNA靶序列，而实验结果与预期设想有所差异，这提示还应该进一步选择一些其它潜在的靶序列（位于编码其它蛋白的基因上）来测试其干扰效率，才有可能得到更适合用于基因治疗的RNAi效应。

与常规的急性病毒感染后人体的天然免疫功能升高相反，SARS患者在感染初始到病情持续进展的过程中（在发病后第3～25天），其体内天然免疫功能一直严重受损，尤其是NK细胞和Ⅱ型DC细胞的数量和功能显著下降[13]。天然免疫构成了人体抵抗病原体的重要防线，一旦遭破坏，SARS病毒紧接着就在肺部大量复制，直接引起肺组织的炎症和坏死。随着病毒的不断复制，患者的病情将不断恶化，呈进行性加剧。所以早期抑制SARS病毒的复制是治疗的关键。此时如果利用针对SARS病毒的质粒表达型siRNA诱导细胞产生RNAi效应，就极可能有效抑制病毒复制，降低病毒载荷，阻抑病毒扩散，从而减小其危害性，“挽救”机体的天然免疫功能。同时，在发病早期使用表达siRNA的质粒进行基因治疗，可以控制住病毒，为采用其它治疗手段赢得宝贵时间。另外，这还可以避免临床上长时间的、大剂量的使用激素进行治疗，因为实践已经证明大剂量使用激素后的一系列副作用会带来严重后果。由于RNAi的特异性，转染了表达siRNA质粒的细胞的正常功能不会受到影响，所以这种质粒还有用于预防SARS的潜在性。

目前还没有治疗SARS的特效药，主要还是靠对症进行各种支持治疗。而利用RNAi来抑制SARS病毒复制、保护细胞免受病毒攻击，在体外现已获得证实。这为预防、治疗SARS提供了新的思路和方法。如果改变表达siRNA的载体，例如用腺病毒载体提高转染细胞的效率，并且选择被干扰效率更高的序列为治疗靶点，那么用针对SARS的RNAi作为基因治疗手段将会更有前途。

参考文献：

[1] Ksiazek T G, Erdman D, Goldsmith C S, *et al*. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome[J]. N Engl J Med, 2003, 348(20): 1953－1966.

[2] Drosten C, Gunther S, Preiser W, *et al*. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome[J]. N Engl J Med, 2003, 348(20): 1967－1976.

[3] Qin X F, An D S, Chen I S, *et al*. Inhibiting HIV-1 infection in human T cells by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA against CCR5 [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(1): 183－188.

[4] Yokota T, Sakamoto N, Enomoto N, *et al*. Inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by synthetic and vector-derived small interfering RNAs[J]. EMBO Rep, 2003, 4(6): 602－608.

[5] Wilson J A, Jayasena S, Khvorova A, *et al*. RNA interference blocks gene expression and RNA synthesis from hepatitis C replicons propagated in human liver cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(5): 2783－2788.

[6] Klein C, Bock C T, Wedemeyer H, *et al*. Inhibition of hepatitis B virus replication *in vivo* by nucleoside analogues and siRNA[J]. Gastroenterology, 2003, 125(1): 9－18.

[7] Ge Q, McManus M T, Nguyen T, *et al*. RNA interference of influenza virus production by directly targeting mRNA for degradation and indirectly inhibiting all viral RNA transcription[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(5): 2718－2723.

[8] 李 阳，倪 兵，石辛甫，等. RNA干扰能有效抑制SARS相关冠状病毒复制[J]. 第三军医大学学报，2004，26(2)：封2.

[9] 王福生. 传染性非典型肺炎的病原学鉴定及其意义[J]. 中华流行病学杂志，2003，24(5)：344－346.

[10] 吕燕波，万 瑛，吴玉章. SARS病毒S蛋白的B细胞表位预测[J]. 第三军医大学学报，2004，26(2)：101－103.

[11] Paddison P J, Caudy A A, Bernstein E, *et al*. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells[J]. Genes Dev, 2002, 16(8): 948－958.

[12] Holen T, Amarzguioui M, Wiiger M T, *et al*. Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor[J]. Nucleic Acids Res, 2002, 30(8): 1757－1766.

[13] 王福生，徐东平. SARS冠状病毒的特点和致病机制的研究[J]. 传染病信息，2003，16(2)：67－68.

（编辑 王 红）