文章编号:1000-5404(2007)13-1293-05

论著

Ad-delE1b55kD-shRNA/Survivin-EGFP的构建及鉴定

王春毅,傅仲学 (重庆医科大学附属第一医院普通外科,重庆 400016)

提 要:目的 构建特异性强,转染率高,针对人Survivin进行RNA干扰的肿瘤增殖型腺病毒载体(Ad-delE1b55kD-shRNA/Survivin-EGFP)。**方法** 将针对人Survivin的shRNA的基因序列及EGFP基因序列克隆至肿瘤增殖型腺病毒穿梭质粒pAd-delE1b55kD;HEK-293细胞中包装出毒得到重组腺病毒Ad-delE1b55kD-shRNA/Survivin-EGFP并测序鉴定。用重组腺病毒感染结肠癌细胞HT-29并检测转染率,用RT-PCR和Western blot分别检测转染后的HT-29细胞中Survivin mRNA和蛋白表达的变化。**结果** 序列测定证明针对人Survivin的shRNA序列及EGFP序列被成功构建到肿瘤增殖型腺病毒载体中;Ad-delE1b55kD-shRNA/Survivin-EGFP对结肠癌细胞HT-29的转染效率显著高于增殖缺陷型腺病毒载体和脂质体载体($P<0.01$);而对肝细胞的转染率则显著低于对结肠癌细胞株HT-29的转染($P<0.01$)。与复制缺陷型腺病毒载体和脂质体载体比较,转染Ad-delE1b55kD-shRNA/Survivin-EGFP后,HT-29细胞中Survivin mRNA拷贝数及蛋白表达显著降低($P<0.01$)。**结论** 构建成功携带针对人Survivin的shRNA的肿瘤增殖型腺病毒载体Ad-delE1b55kD-shRNA/Survivin-EGFP,其能选择性地高效转染结肠癌细胞株HT-29并有效干扰Survivin,且较之增殖缺陷型腺病毒载体和脂质体载体具有更高的干扰效率。

关键词:肿瘤增殖型腺病毒;RNA干扰;存活素;结肠癌
中图法分类号:R735.3;R73-36⁺2 **文献标识码**:A

Construction and identification of conditionally replicating adenovirus vector Ad-delE1b55kD-shRNA/Survivin-EGFP

WANG Chun-yi, FU Zhong-xue (Department of General Surgery, The First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: **Objective** To construct the conditionally replicating adenovirus vector Ad-delE1b55kD-shRNA/Survivin-EGFP that can transfects into HT-29 effectually and selectively and contains shRNA targeting to human Survivin gene. **Methods** EGFP gene and shRNA gene were inserted into pAd-delE1b55kD, then pAd-delE1b55kD-shRNA/Survivin-EGFP was obtained. The plasmid and pBHGE3 were cotransfected into HEK-293 cell to obtain the conditionally replicating adenovirus vector Ad-delE1b55kD-shRNA/Survivin-EGFP. Then DNA of the adenovirus vector was extracted and identified. The transfection efficiency of the vector to HT-29 and LO2 was detected. The expression of Survivin mRNA and protein was detected by RT-PCR and Western blot. **Results** EGFP gene and shRNA gene targeting to human Survivin mRNA were inserted into conditionally replicating adenovirus vector successfully, proven by sequencing. The transfection efficiency to HT-29 of Ad-delE1b55kD-shRNA/Survivin-EGFP was significantly higher than replication defective adenovirus and liposome vector ($P<0.01$). After transfection of Ad-delE1b55kD-shRNA/Survivin-EGFP, mRNA and protein of Survivin gene in HT-29 cells were obviously reduced. **Conclusion** A conditionally replicating adenovirus vector was constructed and identified successfully. It can transfect to HT-29 and silence Survivin effectually and selectively.

Key words: conditionally replicating adenovirus; RNA interference; Survivin; colon carcinoma

基金项目:重庆市自然科学基金(2005BB5225)
Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (2005BB5225)
作者简介:王春毅(1977-),男,重庆市人,博士研究生,医师,主要从事消化道肿瘤的基因治疗方面的研究。电话:13508340464
通讯作者:傅仲学,电话:(023)89012302
收稿日期:2006-09-04;**修回日期**:2006-12-01

RNA 干扰技术是目前研究肿瘤基因治疗最热门的课题之一，但在此研究领域中，脂质体等为载体的 RNA 干扰存在对目的细胞的转染低且特异性而严重影响其干扰效能的难题[1]；Survivin 高度选择性地表达于胚胎发育组织和大多数肿瘤组织，而在正常成熟组织中不表达[2-5]。本研究旨在构建携带针对人 Survivin 的 shRNA 的肿瘤增殖型腺病毒载体 Ad-delE1b55kD-shRNA/Survivin-EGFP，探讨其是否具有对结肠癌细胞株 HT-29 转染的特异性和高效性，以及其介导的 RNA 干扰对结肠癌细胞 HT-29 中 Survivin mRNA 的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人结肠癌细胞株 HT-29 由重庆医科大学病理生理学研究室提供，pIRES-EGFP 质粒、肿瘤增殖型腺病毒穿梭质粒 pAd-delE1b55kD 为本研究组构建并保有。5 型腺病毒穿梭质粒 pCA13 及骨架质粒 pBHGE3 为加拿大 Microbix Biosystems 公司产品。Lipofectamine 2000 为 Invitrogen 公司产品。内切酶、T_4 DNA 连接酶及 λ-*Eco* T14 I digest DNA 标准均购自宝生物工程（大连）有限公司。DNA 胶回收试剂盒购自 Omega 公司。RT 试剂盒为东洋纺（上海）生物科技有限公司产品，*Taq* DNA 聚合酶及缓冲系统购自 Promega（北京）生物技术有限公司。

设计的针对人 Survivin 的 shRNA 基因序列 4 对（序列两端带有 *Xho* Ⅰ + *Bam*H Ⅰ 酶切位点，以及 U6 启动子和 TTTTTT 终止尾）交武汉市晶赛生物工程技术有限公司合成，分别构建于载体 pMD-18T-shRNA 中。shRNA 序列 1：5′-GAAAGTGCGCCGTGCCATCTTCAAGACGGATGGCACGGCGCACTTTC-3′；shRNA 序列 2：5′-GGACCACCGCATCTCTACATTCAAGACGTGTAGAGATGCGGTGGTCC-3′；shRNA 序列 3：5′-GGCTGGCTTCATCCACTGCTTCAAGACGGCAGTGGATGAAGCCAGCC-3′；shRNA 序列 4：5′-GCATTCGTCCGGTTGCGCTTTCAAGACGAGCGCAACCGGACGAATGC-3′（下划线处为 Loop 结构）。Survivin mRNA 引物和病毒 DNA PCR 鉴定引物均由上海英骏生物技术有限公司合成。

1.2 构建 pCA13-shRNA/Survivin-EGFP

将 pIRES-EGFP 质粒及 pCA13 质粒用 *Eco*R Ⅰ + *Xba* Ⅰ 双酶切，将回收的 EGFP 片段插入到 pCA13 中，获得重组质粒 pCA13/EGFP。*Bgl* Ⅱ 酶切鉴定，出现约 2 056、6 357 bp 为正确。将带有针对人 Survivin 的 shRNA 基因序列表达框的载体 pMD-18T-shRNA 用 *Xho* Ⅰ + *Bam*H Ⅰ 酶切，回收 400 bp 的基因序列表达框。用 *Xho* Ⅰ + *Bam*H Ⅰ 酶切重组质粒 pCA13-EGFP，将回收的基因序列表达框定向插入到 pCA13-EGFP，获得重组肿瘤增殖缺陷型腺病毒穿梭质粒 pCA13-shRNA/Survivin-EGFP。*Xho* Ⅰ + *EcoR* Ⅰ 酶切鉴定，出现约 1 481、7 332 bp 条带为正确。

1.3 构建 pAd-delE1b55kD-shRNA/Survivin-EGFP

将 pCA13-shRNA/Survivin-EGFP 用 *Bgl* Ⅱ 酶切，胶回收得到含 CMV 启动子、shRNA 的基因序列及报告基因 EGFP 的 DNA 片段。将其克隆至 pAd-delE1b55kD 的 *Bgl* Ⅱ 酶切位点，获得 pAd-delE1b55kD-shRNA/Survivin-EGFP（E1 区缺失的携带针对 Survivin 的 shRNA 基因片段及报告基因 EGFP 的肿瘤增殖型腺病毒穿梭质粒），*Xba* Ⅰ 酶切鉴定，出现约 3 000、8 900 bp 的条带为正确。

1.4 Ad-delE1b55kD-shRNA/Survivin-EGFP 的包装、纯化及测序鉴定

将质粒 pAd-delE1b55kD-shRNA/Survivin-EGFP 及 5 型腺病毒骨架质粒 pBHGE3 用 Lipofectamine 2000 共转染 HEK-293 细胞株。1 ~ 2 周后可观察到细胞病变效应后，收集病变的 HEK-293 细胞，用病毒保存液重悬，提取病毒 DNA，加入 PCR 鉴定引物 Ad1 及 Ad2 进行 PCR 扩增并测序鉴定，扩增序列应为插入的外源基因序列 EGFP + 针对人 Survivin 的 shRNA 基因序列表达框，序列长度约为 1 800 bp。将鉴定后正确的重组腺病毒扩增，氯化铯密度梯度离心法纯化，$TCID_{50}$ 法检测病毒滴度。将 pCA13-shRNA/Survivin-EGFP 及 5 型腺病毒骨架质粒 pBHGE3 用 Lipofectamine 2000 共转染 HEK-293 细胞株，以同样方法重组获得携带针对人 Survivin 的 shRNA 的增殖缺陷型腺病毒 Ad-shRNA/Survivin-EGFP。

1.5 细胞转染及转染率检测

实验分组：A 组：PBS 空白对照组；B 组：Ad-shRNA/Survivin-EGFP 组（增殖缺陷型腺病毒组）；C 组：脂质体转染组；D 组：Ad-delE1b55kD-shRNA/Survivin-EGFP 组（肿瘤增殖型腺病毒组）。以 2×10^5 接种 HT-29 细胞于 6 孔培养板，24 h 后换无血清培养液，以相同感染复数（MOI = 2）分别加入重组腺病毒 Ad-delE1b55kD-shRNA/Survivin-EGFP、Ad-shRNA/Survivin-EGFP 或 PBS，37 ℃，5% CO_2 孵箱培养 2 h，每 15 分钟十字摇晃 2 次。之后换含 10% 胎牛血清的培养液继续培养。脂质体转染组分别用 50 μl 无血清 RPMI1640 将 pCA13-shRNA/Survivin-EGFP 质粒和脂质体按 1∶2 稀释，5 min 内将两者轻柔混匀，室温下孵育 20 min，形成 Lipofectamine 2000 质粒复合物，加入细胞中轻柔摇匀，37 ℃，5% CO_2 孵箱中孵育。48 h 后在荧光显微镜下观测各组 EGFP 表达情况，并收集细胞，PBS 重悬后用流式细胞仪检测各组转染率。

同法转染肝细胞 LO2：A1 组：PBS 空白对照组；B1 组：Ad-shRNA/Survivin-EGFP 组；C1 组：脂质体转染组；D1 组：Ad-delE1b55kD-shRNA/Survivin-EGFP 组。

1.6 HT-29 细胞中 Survivin mRNA 的变化

转染后 24 h，RNArose 提取细胞 RNA，逆转录为 cDNA，加入 Survivin mRNA 的引物 Sur1 及 Sur2 进行 PCR 扩增，凝胶数字扫描成像系统照相并测定条带积分光吸收度（intergral A，IA）值，以待检基因条带与内参条带 GAPDH 的 IA 比值作为目的基因的相对表达量。

1.7　HT-29 细胞内 Survivin 蛋白的变化

转染后 48 h 收集细胞，蛋白提取液提取总蛋白，定量，Western blot 检测，DAB 显色，发光成像仪取像并测定条带 A 值，以待检基因条带与内参条带 GAPDH 的 IA 比值作为目的蛋白的相对量。各组细胞的 Survivin 蛋白相对表达量/PBS 空白对照组细胞 Survivin 蛋白相对表达量 = 各重组腺病毒组细胞的 Survivin 蛋白表达抑制率(%)。

1.8　统计学分析

实验资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SAS 9.1 统计软件，进行多组间比较的方差分析。

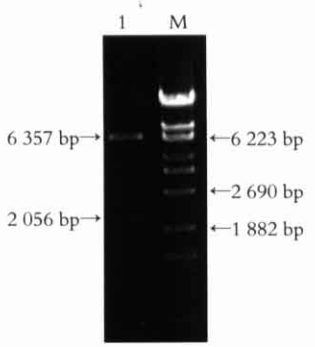
2　结果

2.1　shRNA 序列筛选结果

转染后 48 h，经 ImageMsater TotalLab 图像系统分析，各组 HT-29 细胞中 Survivin mRNA 相对表达量分别为：A 组 = (0.117 ±0.078)、B 组 = (0.251 ±0.101)、C 组 = (0.879 ±0.214)、D 组 = (0.895 ±0.204)，组间比较有统计学意义($P<0.05$)。可见在设计的 4 对 shRNA 序列中，序列 1 对人 Survivin mRNA 的抑制效果最好，故选取 shRNA 序列 1 进行进一步实验。

2.2　酶切鉴定重组质粒 pCA13-EGFP

将重组质粒 pCA13-EGFP 用 *Bgl* Ⅱ 酶切，出现约 2 056、6 357 bp 2 条带(图 1)。



M：λ-*Eco* T14 I digest DNA 标准；1：质粒 pCA13-EGFP 的 *Bgl* Ⅱ 酶切产物

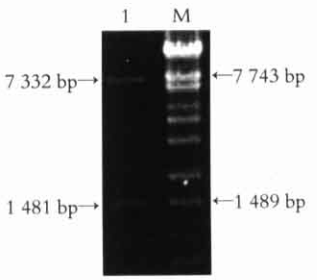
图 1　*Bgl* Ⅱ 酶切鉴定质粒 pCA13-EGFP 电泳图

2.3　酶切鉴定重组质粒 pCA13-shRNA/Survivin-EGFP

将质粒 pCA13-shRNA/Survivin-EGFP 用 *Xho* Ⅰ + *Eco*R Ⅰ 酶切鉴定，出现约 1 481、7 332 bp 的条带(图 2)。

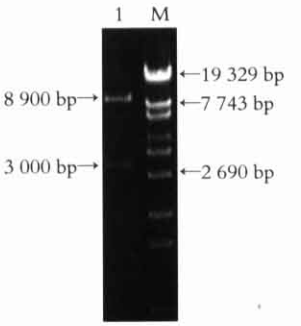
2.4　酶切鉴定重组质粒 pAd-delE1b55kD-shRNA/Survivin-EGFP

将质粒 pAd-delE1b55kD-shRNA/Survivin-EGFP 用 *Xba* Ⅰ 酶切鉴定，出现约 3 000、8 900 bp 的条带为正确(图 3)。



M：λ-*Eco* T14 I digest DNA 标准；1：pCA13-shRNA/Survivin-EGFP 的 hol + *Eco*R Ⅰ 酶切产物

图 2　*Xho* Ⅰ + *Eco*R Ⅰ 双酶切鉴定质粒 pCA13-shRNA/Survivin-EGFP 电泳图



M：λ-*Eco* T14 I digest DNA 标准；1：pAd-delE1b55kD-shRNA/Survivin-EGFP 的 *Xba* Ⅰ 酶切产物

图 3　*Xba* Ⅰ 酶切鉴定 pAd-delE1b55kD-shRNA/Survivin-EGFP 电泳图

2.5　PCR 扩增鉴定重组腺病毒 Ad-delE1b55kD-shRNA/Survivin-EGFP

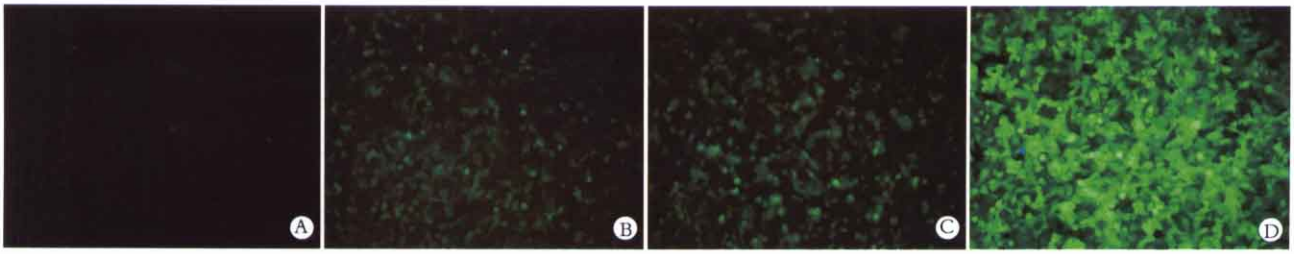
以提取的病毒 DNA 为模板，加入 PCR 鉴定引物 Ad1 及 Ad2 进行 PCR 扩增，出现约 1 800 bp 的条带。另外，测序结果也证实扩增的序列为插入的外源基因序列 EGFP + 针对人 Survivin 的 shRNA 基因序列表达框。

2.6　对比检测实验各组结肠癌细胞株 HT-29 的转染情况

在荧光显微镜下观测转染情况，D 组发绿色荧光的细胞明显多于 B、C 组及 A 组，B 组及 C 组发绿色荧光的细胞数量相近，而 A 组无发绿色荧光的细胞(图 4)。流式细胞仪测定转染率，转换后数据的完全随机设计方差分析结果：$F = 1\ 140.83$，$P<0.01$。SNK 法两两比较结果：D 组转染率显著高于 B、C 组及 A 组($P>0.05$)。

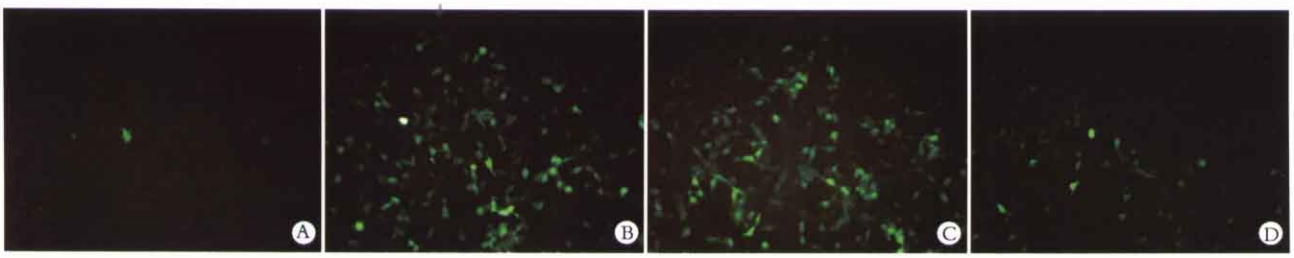
2.7　对比检测实验各组肝细胞株 LO2 的转染情况

在荧光显微镜下观测转染情况，D1 组发绿色荧光的细胞少于 B1 组和 C1 组，B1 组及 C1 组发绿色荧光的细胞数量相近，而 A1 组几乎没有发绿色荧光的细胞(图 5)。



A：PBS 空白对照组；B：Ad-shRNA/Survivin-EGFP 组；C：脂质体转染组；D：Ad-delE1b55kD-shRNA/Survivin-EGFP 组

图4 实验各组结肠癌细胞株 HT-29 的转染情况 （荧光显微镜×200）



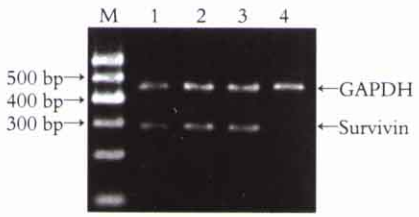
A：PBS 空白对照组；B：Ad-shRNA/Survivin-EGFP 组；C：脂质体转染组；D：Ad-delE1b55kD-shRNA/Survivin-EGFP 组

图5 实验各组肝细胞株 LO2 的转染情况 （荧光显微镜×200）

流式细胞仪测定转染率，转换后数据的完全随机设计方差分析结果：$F=250.65$，$P<0.01$。SNK 法两两比较结果：D1 组转染率低于 B1 组及 C1 组（$P>0.05$）。

2.8 实验各组 HT-29 细胞内 Survivin mRNA 的变化

转染 24 h 后，RT-PCR 法检测结果见图 6。经 ImageMsater TotalLab 图像系统分析，各组 HT-29 细胞中 Survivin mRNA 相对表达量转换后数据的完全随机设计方差分析结果：$F=1\,154.27$，$P<0.01$。SNK 法两两比较结果：D 组表达量显著低于 B 组、C 组及 A 组（$P<0.01$），B 组和 C 组表达量没有显著差异（$P>0.05$）。

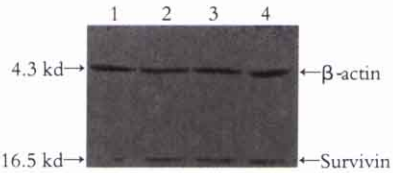


M：标准Ⅰ；1：PBS 空白对照组组；2：Ad-shRNA/Survivin-EGFP 组；3：脂质体转染组；4：Ad-delE1b55kD-shRNA/Survivin-EGFP 组

图6 实验各组 Survivin mRNA RT-PCR 产物电泳图

2.9 实验各组 HT-29 细胞内 Survivin 蛋白水平的变化

蛋白免疫印迹法（Western blot）检测结果如图 7。ImageMsater TotalLab 图像系统分析显示，各组 Survivin 蛋白的表达抑制率转换后数据的完全随机设计方差分析结果：$F=2\,542.52$，$P<0.01$。SNK 法两两比较结果：D 组表达量显著低于 B、C 组及 A 组（$P<0.01$），B 组和 C 组表达量没有显著差异（$P>0.05$）。



1：Ad-delE1b55kD-shRNA/Survivin-EGFP 组；2：Ad-shRNA/Survivin-EGFP 组；3：脂质体转染组；4：PBS 空白对照组

图7 实验各组 Survivin 蛋白印迹杂交图

3 讨论

用 RNAi 技术沉默 Survivin 诱导大肠癌细胞凋亡及抑制其生长增殖，是一个新的研究热点。研究证明[6,7]，通过对 Survivin 基因的 RNA 干扰，能够使人类宫颈癌细胞（HeLa）、人脑胶质瘤细胞（U251）、人类乳腺癌细胞（MCF-7）等凋亡率显著增高、增殖速度明显减低。由此可见，利用 RNAi 技术沉默 Survivin 基因促进肿瘤细胞凋亡，以致最终清除瘤体，是一种具有临床应用前景的、高效的抗肿瘤基因治疗新方法。

RNA 干扰存在的关键问题是如何使尽量多的 shRNA 分子到达目的细胞并持久发挥干扰作用，目前多采用脂质体直接包裹人工合成的改性 siRNA[8] 或包

裹携带在宿主细胞中表达 siRNA 的前体分子（即 shRNA）进行转染[9]。前者由于核酸酶的作用使外源性 siRNA 会逐渐在细胞中代谢掉（特别是细胞快速分裂时）；后者的质粒核苷酸会插入宿主细胞 DNA 序列导致细胞基因的插入激活或灭活，这些都导致 RNA 干扰的作用十分短暂和有限。也有研究用增殖缺陷型腺病毒作为 shRNA 的载体，但增殖缺陷型腺病毒在细胞内不能复制，仅起到将 shRNA 介导入细胞的作用，基因表达时间短，表达量低[10]，仍然没有解决 RNA 干扰效能低的问题。

Bischoff 等[11]研制成功一种 E1b55KD 缺失的腺病毒 ONYX-015，其可选择性转染结肠癌等 P53 基因功能异常的肿瘤细胞并在其中增殖，而对正常细胞几乎没有影响；将其与 5-FU 及顺铂联合治疗 30 例难治性头颈部癌症患者，其中 8 例完全缓解，11 例肿瘤缩小一半以上，总有效率达 63%，是目前最为有效的肿瘤生物治疗的临床报道。这种能在肿瘤细胞中选择增殖的腺病毒被称为肿瘤增殖型腺病毒。只是 ONYX-015 的设计初衷是为了使其在肿瘤细胞中特异性增殖并裂解细胞，从而达到对肿瘤细胞的病毒治疗，所以没有设计能携带外源性基因的位点。我们设想让肿瘤增殖型腺病毒携带 shRNA 的 DNA，通过病毒的特异性增殖就能使其特异性转染到肿瘤细胞中并大量扩增出 shRNA，从而大大提高 RNA 干扰的效能。

在我们的前期工作中[12]通过对 5 型腺病毒穿梭质粒 pXC1 的 E1b55kD 基因序列的缺失突变构建了肿瘤增殖型腺病毒穿梭质粒载体 pAd-delE1b55kD，其具有携带外源性基因的位点。在本实验中，我们重组获得携带针对人 Survivin 的 shRNA 的肿瘤增殖型腺病毒 Ad-delE1b55kD-shRNA/Survivin-EGFP，并通过测序证实构建成功。通过对人结肠癌细胞株 HT-29 和人肝细胞株 LO2 的转染，我们发现其对结肠癌细胞 HT-29 的转染效率显著高于增殖缺陷型腺病毒载体和脂质体载体，达到 96.34%，其携带的 EGFP 能在 HT-29 细胞中高效表达；而对于正常肝细胞，其转染率则显著低于增殖缺陷型腺病毒载体和脂质体载体，为 27.14%。研究结果显示 Ad-delE1b55kD-shRNA/Survivin-EGFP 能特异性地高效转染结肠癌细胞 HT-29。并且，我们以携带相同 shRNA 的增殖缺陷型腺病毒和脂质体载体为对照，探讨了肿瘤增殖型腺病毒介导 RNA 干扰沉默 Survivin 基因对结肠癌细胞 HT-29 中 Survivin 基因 mRNA 及蛋白表达的影响。结果提示，Ad-delE1b55kD-shRNA/Survivin-EGFP 有效干扰结肠癌细胞 HT-29 中 Survivin mRNA，沉默效率明显高于增殖缺陷型腺病毒载体和脂质体载体。研究结果提示 Ad-delE1b55kD-shRNA/Survivin-EGFP 介导的 RNA 干扰较之增殖缺陷型腺病毒载体和脂质体载体具有更高的干扰效率。结合 Ad-delE1b55kD-shRNA/Survivin-EGFP 对结肠癌细胞转染率的研究，我们认为，干扰效率提高的机制在于 Ad-delE1b55kD-shRNA/Survivin-EGFP 携带的针对 Survivin 的 shRNA 在结肠癌细胞 HT-29 中高效表达，从而提高了干扰效率。

参考文献：

[1] Lee S S, Lee R Y, Fraser A G, *et al*. A systematic RNAi screen identifies a critical role for mitochondria in C. elegans longevity[J]. Nat Genet, 2003, 33(1): 40-48.

[2] 苟　欣，何卫阳，肖明朝，等. Survivin 在膀胱癌中的表达及其与癌细胞增殖关系的研究[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(4): 377-378.

[3] 陈锦屏. 凋亡抑制基因 Survivin 在喉鳞癌中的表达及临床意义[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(21): 2156, 2159.

[4] 刘　丰，宋　炯，傅仲学，等. Survivin 的表达与直肠癌细胞凋亡、血管形成及预后的关系[J]. 中华实验外科杂志, 2004, 21(6): 757.

[5] McManus M T, Sharp P A. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs[J]. Nat Rev Genet, 2002, 3(10): 737-747.

[6] Uchida H, Tanaka T, Sasaki K, *et al*. Adenovirus-mediated transfer of siRNA against survivin induced apoptosis and attenuated tumor cell growth *in vitro* and *in vivo*[J]. Mol Ther, 2004, 10(1): 162-171.

[7] Cheng S Q, Wang W L, Yan W, *et al*. Knockdown of survivin gene expression by RNAi induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(5): 756-759.

[8] Urban-Klein B, Werth S, Abuharbeid S, *et al*. RNAi-mediated gene-targeting through systemic application of polyethylenimine (PEI)-complexed siRNA *in vivo*[J]. Gene Ther, 2005, 12(5): 461-466.

[9] Taulli R, Acconero P, Follenzi A, *et al*. RNAi technology and lentiviral delivery as a powerful tool to suppress Tpr-Met-mediated tumorigenesis[J]. Cancer Gene Ther, 2005, 12(5): 456-463.

[10] 褚　亮，刘新垣. 癌症靶向治疗的新趋势[J]. 肿瘤防治杂志, 2005, 12(20): 1583-1588.

[11] Bischoff J R, Kirn D H, Williams A, *et al*. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells[J]. Science, 1996, 274(5286): 373-376.

[12] 王春毅，傅仲学. 肿瘤特异增殖型腺病毒穿梭质粒 pAd-delE1b55kD 的构建[J]. 重庆医科大学学报, 2006, 31(3): 314-317.

（编辑　王　红）