论著

文章编号:1000-5404(2010)08-0744-05

慢病毒载体介导的人肝癌 HepG2 细胞 BC047440 基因沉默

钟 扬,李 靖,黄小兵,郑 璐,杨彤翰,赵弘智,梁 平 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院肝胆外科)

[摘要] 目的 构建 BC047440 基因 RNAi 慢病毒干扰载体,并检测其对人肝癌细胞系 HepG2 细胞中 BC047440 基因的沉默效果。**方法** 针对已经筛选确定的 BC047440 基因 RNAi 有效靶序列,合成 BC047440 基因特异性 shRNA 序列,退火形成双链 DNA,与经 *Hpa* Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ 双酶切后的 pFU-GW-iRNA 载体连接产生 pFU-GW-shBC047440 慢病毒载体,PCR、DNA 测序鉴定阳性克隆。用脂质体转染法将 pFU-GW-shBC047440、pHelper 1.0 载体和 pHelper 2.0 载体共转染 293T 细胞,产生具备感染能力的慢病毒。以 293T 细胞中绿色荧光蛋白的表达水平测定病毒滴度,并测定其对人肝癌细胞株 HepG2 细胞最适感染复数(MOI)。以最适 MOI 感染 HepG2 细胞,分 BC047440-shRNA 组、control-shRNA 组和 HepG2 组;RT-PCR 和 Western blot 检测各组细胞 BC047440 mRNA 及蛋白的表达差异。**结果** 经 PCR 鉴定,成功构建 BC047440 基因 RNAi 慢病毒载体。测定慢病毒滴度为 5×10^8 TU/ml,其在 HepG2 细胞中最适 MOI 为 20;RT-PCR 和 Western blot 检测结果分别显示 BC047440-shRNA 组中 BC047440 mRNA 及 BC047440 蛋白表达较 control-shRNA 组和 HepG2 组明显降低,control-shRNA 组与 HepG2 组间无明显差异。**结论** 成功构建 BC047440 特异性 RNAi 慢病毒载体,感染人肝癌细胞系 HepG2 细胞后,实现了对 HepG2 细胞中 BC047440 基因的有效沉默。

[关键词] BC047440;RNA 干扰;慢病毒载体;人肝癌细胞系 HepG2

[中图法分类号] R394-33;R73-354;R735.7 **[文献标志码]** A

BC047440 silencing in HepG2 cells mediated by lentiviral vector

Zhong Yang, Li Jing, Huang Xiaobing, Zheng Lu, Yang Tonghan, Zhao Hongzhi, Liang Ping (Department of Hepatobiliary Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[Abstract] Objective To construct a lentivirus vector for RNA interference (RNAi) of BC047440 gene, and detect the silence effect of the vector in human hepatocellular liver carcinoma cell line (HepG2). **Methods** The targeting sequence of BC047440 gene which can be effectively silenced in RNA inference was confirmed in our previous study. The cDNA encoding for sense and antisense Oligo DNA fragments of the targeting sequence was designed, synthesized and cloned into the pFU-GW-iRNA vector which had been double digested by the *Hpa* Ⅰ and *Xho* Ⅰ, and vector then the results confirmed by PCR and DNA sequencing. 293T cells were cotransfected with lentiviral vector pFU-GW-shBC047440, pHelper 1.0 and pHelper 2.0 by Lipofectamine 2000, to produce lentiviral vector which can infect other cell lines. The virus titer and the fittest multiplicity of infection (MOI) in HepG2 were measured by the expression level of green fluorescent protein (GFP). The infected HepG2 was divided into BC047440-shRNA group, control-shRNA group and HepG2 group. The changes of BC047440 mRNA and protein level were detected by RT-PCR and Western blot analysis respectively. **Results** The data of PCR demonstrated that the lentivirus RNAi vector of BC047440 was constructed successfully. The titer of virus was 5×10^8 TU/ml, and the fittest MOI in HepG2 was 20. BC047440 and BC047440 mRNA expression of BC047440-shRNA group was obvious lower than the control-shRNA group and HepG2 group, but there was no visible different between the control-shRNA group and HepG2 group. **Conclusion** The lentivirus RNAi vector of BC047440 is constructed successfully. After this lentivirus vector infects HepG2 cells, the target of silencing the expression on BC047440 is achieved.

[Key words] BC047440; RNAi; lentivirus vector; human hepatocellular liver carcinoma cell line (HepG2)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30570843). Corresponding author: Li Jing, Tel: 86-23-68774606, E-mail: xqyylijing@tom.com

[基金项目] 国家自然科学基金(30570843)

[通信作者] 李 靖,电话:(023)68774606,E-mail: xqyylijing@tom.com

原发性肝癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一,其发病率及病死率在恶性肿瘤中均居前列[1]。手术切除及肝移植被认为是最有效的治疗方案,但由于大多数肝癌发现晚、进展快,故而仅有少数患者可以成功施行手术切除或肝移植[2]。研究表明,肝癌的发生、发展是一个涉及多基因、多因素、多步骤的过程,癌基因、抑癌基因、细胞周期调节基因、细胞凋亡基因等众多基因的异常激活或异常失活是肝癌发生的分子基础[3]。近年来对原发性肝细胞癌的基因治疗已成为研究热点之一,通过RNA干扰(RNA interference, RNAi)抑制肿瘤细胞中特定基因的表达,观察其对肿瘤细胞的影响,进而推测该基因在肿瘤发生、发展的作用,针对该基因进行基因治疗研究。本科室在前期的研究中发现1条功能未知的基因BC047440,其在肝癌组织中呈高表达,且与肝癌的恶性程度呈正相关[4]。本实验通过构建针对BC047440基因的特异性RNAi慢病毒载体,将其感染人肝癌细胞HepG2,以期实现对HepG2细胞中BC047440基因的有效沉默,并通过检测HepG2细胞中BC047440 mRNA及蛋白的表达予以验证,从而为进一步了解BC047440对HepG2细胞生物学行为的影响并探讨其作用机制,寻找肝癌治疗新途径奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

人肝癌细胞系HepG2细胞由本科室前期保存,293T细胞由本院中心实验室保存。PCR用试剂primer、dsDNA oligo、pFU-GW-iRNA载体及辅助包装质粒(吉凯公司),RNAiso Plus、PrimeScript RT reagent Kit(TaKaRa公司),r*Taq* DNA Polymerase(ToYoBo公司),*Hpa* Ⅰ和*Xho* Ⅰ酶、T_4 DNA ligase、T_4 DNA ligase buffer(NEB公司),Opti-MEM、Lipofectamine 2000(Invitrogen公司),DL5000 DNA Marker(TaKaRa公司),DNA Marker Ⅰ(天根公司),BeyoECL Plus化学发光剂(碧云天公司),DMEM/H培养基(HyClone公司),胰酶(Gibco公司),标准胎牛血清(TBD公司),PBS(博士德公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 BC047440特异性RNAi慢病毒载体的构建

1.2.1.1 特异性shRNA序列的设计 从GenBank查找BC047440基因序列(GI:28703691),应用Ambion公司的RNA干扰设计软件,设计针对人BC047440基因的特异性siRNA序列为[5]:5′-CTCTGGGTCTTAGTGAGGA-3′(471~489 bp,GC含量52.6%)。通过BLAST同源性分析,排除了非特异性抑制其他基因序列的可能。根据pFU-GW-iRNA载体多克隆位点,在片段两端设计相应*Hpa* Ⅰ和*Xho* Ⅰ酶切位点,确定shRNA序列为:正义链:5′-TGCTCTGGGTCTTAGTGAGGATTCAAGAGATCCTCACTAAGACCCAGAGTTTTTTC-3′;反义链:5′-TCGAGAAAAAACTCTGGGTCTTAGTGAGGATCTCTTGAATCCTCACTAAGACCCAGAGCA-3′。

1.2.1.2 重组慢病毒质粒的构建 取经*Hpa*Ⅰ和*Xho*Ⅰ双酶切回收pFU-GW-iRNA载体1 μl,退火的shRNA片段1 μl,与T_4 DNA ligase buffer 1 μl,T_4 DNA ligase 1 μl,ddH_2O 6 μl混合成10 μl反应体系,4 ℃连接12 h。连接产物转化*E. coli* DH5α感受态菌,挑取阳性克隆行PCR鉴定、DNA测序。PCR鉴定阳性克隆的引物:上游:5′-GCCCCGGTTAATTTGCATAT-3′;下游:5′-GAGGCCAGATCTTGGGTG-3′,该载体命名为pFU-GW-shBC047440。

1.2.1.3 慢病毒包装 取各载体(pFU-GW-shBC047440载体20 μg,pHelper 1.0载体15 μg,pHelper 2.0载体10 μg)与Opti-MEM混合为2.5 ml;取100 μl Lipofectamine 2000试剂与2.4 ml Opti-MEM混合。将各载体与Lipofectamine 2000稀释液混合,室温下孵育20 min,加入293T细胞培养瓶中混匀,于37 ℃、5% CO_2细胞培养箱中培养。8 h后弃去培养液,PBS清洗1次,加入含10% FBS的完全培养基20 ml,于37 ℃、5% CO_2细胞培养箱内继续培养。48 h后收集293T细胞上清液,离心获得病毒浓缩液,分装后置-70 ℃冰箱中保存。

1.2.2 重组慢病毒滴度的测定 采用逐孔稀释滴度测定法测定重组慢病毒滴度。取对数生长期293T细胞,以2×10^3/孔接种至96孔板,分8组,每组设3个复孔,每孔加入含10% FBS的DMEM培养基100 μl,置37 ℃,5% CO_2孵箱下培养24 h。准备8个无菌的Ep管,每管中加入90 μl的无血清培养基,取待测定的病毒原液10 μl加入第1个管中,混匀后,取10 μl加入第2个管中,以此操作直至最后一管。选取对应细胞孔,吸弃90 μl培养基,加入90 μl稀释好的病毒溶液,于37 ℃,5% CO_2孵箱培养。各组加入病毒原液相当于10、1、10^{-1}、10^{-2}、10^{-3}、10^{-4}、10^{-5}、10^{-6} μl。24 h后,补足完全培养基至200 μl。72 h后,观察绿色荧光蛋白(GFP)表达情况,病毒滴度为每孔表达GFP的细胞数/病毒原液量。

1.2.3 重组慢病毒感染HepG2细胞

1.2.3.1 测定最适感染复数(MOI值) 取对数生长期HepG2细胞,以5×10^3/孔接种于96孔板,分8组,每组设3个复孔,每孔加入含12% FBS的DMEM培养基100 μl,于37 ℃,5% CO_2孵箱培养。24 h后更换为无血清培养基,每组分别加入MOI值为1、2、5、8、10、15、20、30的病毒液,补足无血清的DMEM培养基至100 μl;间隔15 min轻轻晃动培养板以使病毒颗粒与细胞充分接触,2 h后静置37 ℃,5% CO_2孵箱培养,10 h后更换为含12% FBS的DMEM培养基200 μl。72、96 h后在荧光显微镜下观察细胞中绿色荧光表达,选择细胞状态较好、绿色荧光表达率较高、强度较强的MOI值作为待测最适MOI值。

1.2.3.2 流式细胞术检测感染率 取对数生长期的HepG2细胞,以1×10^5/瓶接种于25 ml培养瓶,取重组慢病毒以待测最适MOI值感染HepG2细胞,于37 ℃,5% CO_2孵箱培养96 h,流式细胞仪检测表达绿色荧光的HepG2细胞的百分比,同时检测其中绿色荧光的表达强度,确定最适MOI值。

1.2.3.3 重组慢病毒感染HepG2细胞 取处于对数生长期

HepG2 细胞，分为 BC047440-shRNA 组、control-shRNA 组及 HepG2 组，每组以 2×10^5/瓶接种至 25 ml 培养瓶，培养 24 h 后，弃去培养基，BC047440-shRNA 组、control-shRNA 组以最适 MOI 值分别加入对应重组慢病毒，补足无血清培养基至 5 ml，间隔 15 min 轻轻晃动培养瓶以使病毒颗粒与细胞充分接触，2 h 后静置 37 ℃，5% CO_2 孵箱培养，10 h 后弃去培养液，加入含 12% FBS 的 DMEM 培养基 5 ml，96 h 后提取总 RNA 及总蛋白行 RT-PCR 及 Western blot 检测。

1.2.4 RT-PCR 检测重组慢病毒对 HepG2 细胞 BC047440 mRNA 表达的影响 重组慢病毒感染 HepG2 细胞 96 h 后提取各组细胞总 RNA。弃去细胞培养瓶内培养基，PBS 洗涤 2 次，加入 1 ml RNAiso Plus 提取细胞总 RNA，RT-PCR 法检测各组 BC047440 mRNA 表达情况。逆转录反应按照 TaKaRa 公司 PrimeScript RT reagent Kit 说明书进行。

根据 BC047440 序列设计其引物：上游 5′-GGAAAGATTTCTGGCTCAGCTC-3′；下游 5′-AGTGGCTTTCTCCTCACTAAGACC-3′；产物大小 181 bp。β-actin 引物：上游 5′-CCAACCGCGAGAAGATGA-3′；下游 5′-CCAGAGGCGTACAGGGATAG-3′；产物大小 98 bp。PCR 反应条件：94 ℃，5 min；94 ℃，30 s，65 ℃，30 s，72 ℃，45 s，28 个循环。PCR 产物于 2.0% 琼脂糖凝胶电泳。

1.2.5 Western blot 检测重组慢病毒对 HepG2 细胞 BC047440 蛋白表达的影响 重组慢病毒感染 HepG2 细胞 96 h 后提取各组细胞总蛋白。弃去细胞培养瓶内培养基，预冷 PBS 清洗 2 次，各加入 RIPA 裂解液 150 μl 提取细胞总蛋白，BCA 法检测蛋白浓度。每组取等量蛋白，与 1/4 样品体积的 5× 上样缓冲液混匀，100 ℃变性 5 min。聚丙烯酰胺凝胶（10% 分离胶、4% 浓缩胶）电泳，恒流电转（5.5 mA/cm^2）至 PVDF 膜，于 5% TBST 脱脂奶粉溶液中封闭 1 h，TBST 溶液洗涤 3 次 ×10 min。将 PVDF 膜放入一抗液（1∶600）4 ℃过夜；TBST 溶液洗涤 3 次 ×10 min；将 PVDF 膜置于二抗液（1∶1 000）37 ℃孵育 2 h；TBST 溶液洗涤 3 次 ×10 min；加 ECL 化学发光剂 1 ml，β-actin 作为内参，凝胶扫描仪采集图像。

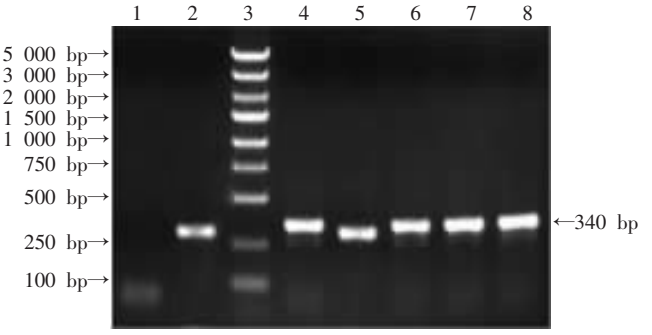
2 结果

2.1 质粒 DNA 鉴定结果

BC047440 基因特异性 shRNA 的寡核苷酸序列经退火形成双链 DNA，与经 *Hpa* Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ 双酶切后的 pFU-GW-iRNA 载体连接，连接产物转化感受态菌后，挑取 5 个重组克隆作 PCR 鉴定，已连接 shRNA 片段的阳性克隆 PCR 片段大小为 340 bp，未连接 shRNA 片段的空载体克隆 PCR 片段大小为 299 bp。除阳性克隆 2 外，其余 4 个阳性克隆扩增产物大小均为 340 bp（图 1），鉴定结果与预期相符。选取 1 号阳性克隆进行 DNA 测序无误，进行后续病毒包装。

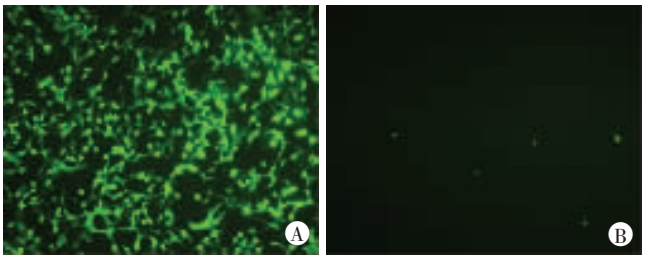
2.2 重组慢病毒滴度的测定

采用逐孔稀释滴度测定法测定重组慢病毒滴度。重组慢病毒感染 293T 细胞后 72 h 观察其绿色荧光表达，可见表达荧光细胞数随稀释倍数的递增而递减。在 10^{-5} μl 病毒原液的孔中观察到 5 个带有荧光的细胞，说明该孔中至少有 5 个病毒颗粒感染了细胞（图 2），该病毒滴度为荧光细胞数除以病毒原液量，即 $5/(10^{-5})=5\times10^5$，单位 TU/μl，即 5×10^8TU/ml。



1：阴性对照（ddH_2O）；2：control-shRNA；3：DNA 标准；4～8：阳性克隆 1、2、3、4、5

图 1 重组克隆凝胶电泳结果

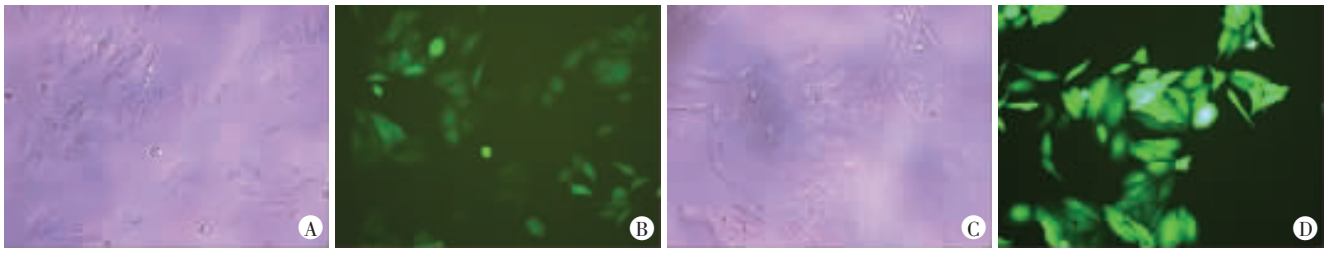


A：1 μl（×100）；B：10^{-5} μl（×50）

图 2 不同体积慢病毒液感染 293T 细胞 72 h 后于荧光显微镜观察

2.3 重组慢病毒感染 HepG2 细胞

2.3.1 测定最适 MOI 值 重组慢病毒感染 HepG2 细胞 72、96 h 后，分别在荧光显微镜观察，可见当 MOI 值为 20 时，细胞状态最佳，荧光表达率较高，荧光强度较强；且随感染时间延长，细胞内荧光强度增加（图 3）。故选取 20 作为待测最佳 MOI。



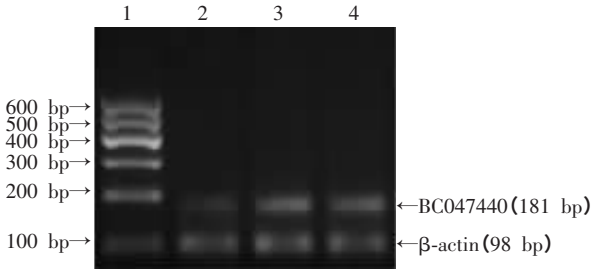
A：感染 72 h 后（LM）；B：感染 72 h 后（荧光显微镜）；C：感染 96 h 后（LM）；D：感染 96 h 后（荧光显微镜）

图 3 重组慢病毒感染 HepG2 细胞（MOI=20）72、96 h 后于光镜及荧光显微镜观察（×200）

2.3.2 流式细胞术测定感染率 以 1×10^5/瓶种植 HepG2 细胞于 25 ml 培养瓶，取重组慢病毒以 MOI = 20 感染 HepG2 细胞，于 37 ℃，5% CO_2 孵箱培养 96 h，流式细胞仪检测表达绿色荧光的 HepG2 细胞百分比为 88.15%，荧光平均强度为 33.0%。最终确定以 MOI = 20 作为最适 MOI 值。

2.4 重组慢病毒对 HepG2 细胞 BC047440 基因表达的影响

RT-PCR 证实 BC047440-shRNA 组的 BC047440 mRNA 表达量较 control-shRNA 组和 HepG2 组的 BC047440 mRNA 表达量明显降低，control-shRNA 组和 HepG2 组间 BC047440 mRNA 表达量无明显差异（图 4）。

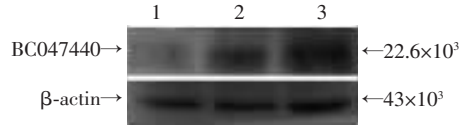


1：DNA 标准；2：BC047440-shRNA；3：control-shRNA；4：HepG2

图 4 BC047440 PCR 产物凝胶电泳结果

2.5 重组慢病毒对 HepG2 细胞 BC047440 蛋白表达的影响

Western blot 检测结果证实，BC047440-shRNA 组的 BC047440 蛋白表达量较 control-shRNA 组和 HepG2 组的 BC047440 蛋白表达量明显降低，control-shRNA 组和 HepG2 组间 BC047440 蛋白表达量无明显差异（图 5）。使用 Gel-Pro analyzer 4.0 分析软件检测 BC047440 蛋白条带灰度，以 β-actin 为参照，设 HepG2 组 BC047440 蛋白表达率为 100%，计算出 BC047440-shRNA 组 BC047440 蛋白抑制率为 58.96%。



1：BC047440-shRNA；2：control-shRNA；3：HepG2

图 5 BC047440 蛋白 Western blot 检测结果

3 讨论

原发性肝癌的发生与发展是一个涉及多基因的多阶段过程，涉及的癌基因、抑癌基因及相关基因有 N-ras、p53、pTEN、C-myc、C-fos、C-est-2、IGF-Ⅱ、CSF-IR 等[6-8]，但其发生、发展机制极其复杂，具体的分子机制尚未完全阐明，因此寻找新的肝癌相关基因对阐明肝癌发生机制、获得肝癌治疗新途径具有重大意义。在前期的研究中，我们利用抑制消减杂交技术分离出在肝癌组织中高表达的 EST 片段[9,10]，采用 cDNA 末端快速扩增方法（rapid amplification of cDNA ends, RACE），获得了 1 条全长 1 476 bp 的 cDNA 序列，通过 GenBank 检索，发现其与 1 条近期发现但功能未知的基因同源（登录号 BC047440），该基因定位于 20 号染色体 20q11.22，编码一种由 200 个氨基酸组成相对分子量为 22.6×10^3 的蛋白，Prosite 分析提示其可能为一种功能蛋白。通过对肝癌组织和癌旁肝组织进行 RT-PCR 分析显示，BC047440 基因在肝癌组织中的表达强度明显高于与其相对应的正常肝组织，且其表达强度与肝癌肿瘤直径、门静脉受侵程度呈正相关[4]；此外，多组织的 Northern 杂交也证实 BC047440 基因在多种肿瘤组织中有明显的表达，提示 BC047440 基因在包括肝癌在内的多种肿瘤组织中有表达增强的趋势。将 BC047440 基因放到了癌肿基因组解剖计划（cancer genome anatomy project, CGAP）的多个 SAGE 文库，通过虚拟 Northern blot 分析 BC047440 的基因表达谱后，发现 BC047440 基因在乳腺、胃、脑、胰腺、卵巢、前列腺等多个 SAGE 肿瘤文库中均有表达，而仅在脑、骨髓等几个正常文库中表达，由此推测它可能参与了肿瘤形成的某个环节[11]。进一步通过半定量 RT-PCR 检测了多种恶性肿瘤及其癌旁组织中 BC047440 mRNA 表达情况，结果显示在肝癌、胃癌、胆管癌、大肠癌组织中 BC047440 mRNA 表达均高于其对应癌旁组织，提示 BC047440 基因可能在相关肿瘤的发生、发展中发挥了一定作用[12]。本研究设计并合成了 BC047440 基因 shRNA 干扰序列，构建了针对 BC047440 基因的 RNAi 慢病毒干扰载体，将干扰片段导入 HepG2 细胞，以期通过 RNAi 机制实现对 HepG2 细胞中 BC047440 基因的沉默。

RNAi 是首先在线虫体内发现的一种生物现象，即双链 RNA（double stranded RNA, dsRNA）能抑制序列特异性基因的表达[13]，阻断相应基因表达的转录后水平的基因沉默机制。RNAi 机制中存在催化和放大的机制[14]，能起到高效抑制目的基因表达的效果，故近年来运用 RNA 干扰机制对肿瘤性疾病进行治疗已成为肿瘤及其他疾病治疗中的重要研究方面[15,16]。

而将干扰片段导入真核细胞并进行转录和表达的方式有多种，主要包括非病毒载体系统的细胞转染和以病毒为载体的细胞感染方式[17-19]。

非病毒载体系统的细胞转染主要方式是质粒载体介导方式，是目前较常用和经济的方式，但存在转染效率低、目的基因表达弱、持续时间短的缺点。而以病毒为载体的细胞感染方式，则具有感染效率高、目的基因表达强、持续时间长的优点。目前常用的病毒载体有逆转录病毒、腺病毒及慢病毒载体系统。但前两种载

体系统均存在一定局限性:①逆转录病毒虽然具有长期表达的特点,但是只能感染分裂期细胞,不能感染未分裂细胞;②腺病毒载体不能长期稳定表达目的基因,且有较高的免疫原性。较之于前两者,慢病毒载体系统具有其明显优点。慢病毒(lentivirus)载体是以人类免疫缺陷型病毒(HIV)为基础发展起来的基因治疗载体:①它对分裂细胞和非分裂细胞均具有感染能力[20];②可容纳较大的外源性基因片段;③可在体内较长期的表达;④具有低免疫原性[21]。慢病毒载体作为一种新型的基因转导载体,其独特的优点使其在基因功能及基因治疗研究中的应用日益广泛[22,23];与此同时,慢病毒载体对肝细胞有较高的转导效率及较佳的转导效果,更使其在肝脏相关疾病的基因治疗方面有很大的应用前景[24,25],因此选择慢病毒载体作为本实验的理想载体。

本研究构建慢病毒载体后,经293T细胞包装、生产出高滴度的慢病毒颗粒,根据其报告基因GFP表达,测得重组慢病毒滴度为5×10^8TU/ml,其在HepG2细胞中最适MOI值为20。以最适MOI值感染HepG2细胞,经荧光显微镜观察及流式细胞术分析结果显示,慢病毒感染HepG2细胞96 h后可达到88.15%的感染率,33.0%的荧光强度,且其荧光强度有随感染时间增加而增强的趋势。再通过RT-PCR、Western blot检测经慢病毒感染后HepG2细胞中BC047440表达情况,结果表明BC047440-shRNA组的BC047440 mRNA及蛋白表达量较control-shRNA组和HepG2组明显降低(抑制率58.96%),control-shRNA组和HepG2组间BC047440 mRNA及蛋白表达量无明显差异。综合实验数据,证实重组慢病毒构建成功,转导的干扰片段在HepG2细胞中得到长期稳定的表达,达到了特异性沉默人肝癌细胞株HepG2中BC047440基因表达的目的,为进一步研究BC047440基因对HepG2细胞生物学行为的影响、探讨其作用机制、寻找肝癌治疗新途径奠定了基础。

参考文献:

[1] Parkin D M, Bray F, Ferlay J, *et al*. Global cancer statistics, 2002 [J]. CA Cancer J Clin, 2005, 55(2): 74 – 108.

[2] Llovet J M, Bruix J, Gores G J. Surgical resection versus transplantation for early hepatocellular carcinoma: clues for the best strategy[J]. Hepatology, 2000, 31(4): 1019 – 1021.

[3] 王伟丽, 高英堂. 肝癌相关基因及相互作用的研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2008, 16(29): 3289 – 3294.

[4] 郑璐, 李靖, 杨彤翰, 等. BC047440基因在肝细胞癌中的表达及其意义[J]. 中国普通外科杂志, 2006, 15(8): 582 – 585.

[5] 刘世呈, 李靖, 黄小兵, 等. BC047440-siRNA对肝癌HepG2细胞增殖抑制及其分子机制的初步探讨[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(23): 2207 – 2211.

[6] Teufel A, Staib F, Kanzler S, *et al*. Genetics of hepatocellular carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(16): 2271 – 2282.

[7] Martin J, Dufour J F. Tumor suppressor and hepatocellular carcinoma [J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(11): 1720 – 1733.

[8] 叶维法, 杨秉辉, 万得森, 等. 肝胆肿瘤学[M]. 天津: 天津科学技术出版社, 2000: 11 – 14.

[9] 李靖, 韩本立, 黄桂君, 等. 肝癌组织差异表达基因cDNA序列的筛选与鉴定[J]. 中华医学遗传学杂志, 2003, 20(1): 49 – 52.

[10] 赵弘智, 梁平, 李靖, 等. 肝癌相关cDNA片段的快速克隆和表达[J]. 世界华人消化杂志, 2004, 12(8): 1785 – 1788.

[11] 赵弘智, 李靖, 梁平, 等. 一条肝癌相关新基因的全长cDNA克隆[J]. 中华肝脏病杂志, 2005, 13(7): 483, 487.

[12] 郑璐, 李靖, 梁平, 等. 新基因BC047440在多种肿瘤组织中的表达及其意义[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2008, 15(3): 185 – 189.

[13] Fire A, Xu S, Montgomery M K, *et al*. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans[J]. Nature, 1998, 391(6669): 806 – 811.

[14] Dykxhoorn D M, Novina C D, Sharp P A. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003, 4(6): 457 – 467.

[15] Stevenson M. Therapeutic potential of RNA interference[J]. N Engl J Med, 2004, 351(17): 1772 – 1777.

[16] Takeshita F, Ochiya T. Therapeutic potential of RNA interference against cancer[J]. Cancer Sci, 2006, 97(8): 689 – 696 .

[17] 曹明媚, 戚中田. 基因治疗载体的研究进展[J]. 国外医学: 肿瘤学分册, 2004, 31(1): 22 – 26.

[18] 孙昀, 耿小平. 肝癌的基因治疗现状与问题[J]. 肝胆外科杂志, 2006, 14(4): 315 – 317.

[19] 高新生, 林菊生. 原发性肝癌基因治疗的研究进展[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2008, 17(12): 959 – 961.

[20] Buchschacher G L Jr, Wong-Staal F. Development of lentiviral vectors for gene therapy for human diseases[J]. Blood, 2000, 95(8): 2499 – 2504.

[21] Amado R G, Chen I S. Lentiviral vectors--the promise of gene therapy within reach? [J]. Science, 1999, 285(5428): 674 – 676.

[22] Ralph G S, Binley K, Wong L F, *et al*. Gene therapy for neurodegenerative and ocular diseases using lentiviral vectors[J]. Clin Sci (Lond), 2006, 110(1): 37 – 46.

[23] Philpott N J, Thrasher A J. Use of nonintegrating lentiviral vectors for gene therapy[J]. Hum Gene Ther, 2007, 18(6): 483 – 489.

[24] Nguyen T H, Bellodi-Privato M, Aubert D, *et al*. Therapeutic lentivirus-mediated neonatal *in vivo* gene therapy in hyperbiliru binemic Gunn rats[J]. Mol Ther, 2005,12(5): 852 – 859.

[25] Nash K L, Alexander G J, Lever A M. Inhibition of hepatitis B virus by lentiviral vector delivered antisense RNA and hammerhead ribozymes[J]. J Viral Hepat, 2005,12(4): 346 – 356.

(**收稿**:2009-12-29;**修回**:2010-02-01)

(编辑 王小寒)