文章编号:1000-5404(2012)01-0039-05

论著

3种不同survivin基因启动子驱动Apoptin表达的重组慢病毒构建及体外抑瘤效果比较

叶 枫[1*],钟 波[1,2*],但国蓉[1],姜 帆[1],赛 燕[1],赵吉清[1],孙慧勤[3],梁后杰[2],邹仲敏[1] (400038 重庆,第三军医大学:军事预防医学院毒理学研究所[1],西南医院肿瘤科[2],军事预防医学院全军复合伤研究所,创伤,烧伤与复合伤国家重点实验室[3])

[摘要] **目的** 构建3种不同长度的survivin基因启动子融合6×his标签Apoptin cDNA的重组慢病毒载体,经鉴定后行慢病毒包装并感染人结直肠癌细胞(SW480),体外实验观察并比较抑瘤效果。**方法** 克隆3种不同长度的人survivin基因启动子(160、270、987 bp)和Apoptin-6×his cDNA,将其分别连接到pMD18-T载体并在该载体上完成survivin基因启动子和Apoptin基因组装。将组装好的表达盒构建入polyA改造后的慢病毒载体FG12中,利用三质粒包装系统包装成慢病毒。为观察重组慢病毒的抑瘤效果,以最适MOI值感染SW480肿瘤细胞后第5天及第30天,利用Annexin V-PE/7-AAD凋亡试剂盒和流式细胞术检测细胞凋亡和周期变化,Western blot检测Apoptin-6×his表达。**结果** 成功构建3种重组慢病毒载体,经包装浓缩后获得高滴度病毒,可以有效地感染目的细胞(感染效率大于80%)。体外结果提示病毒感染的SW480可以正确表达Apoptin-6×his蛋白,并能在感染后第30天出现明显的凋亡/坏死。其中,含有270 bp启动子的慢病毒抑瘤作用更为明显。**结论** 采用270 bp survivin启动子,apoptin基因构建的重组慢病毒在靶细胞中显示出较好的抑瘤效果。

[关键词] Apoptin基因; survivin启动子;慢病毒;肿瘤特异性
[中图法分类号] R394-33; R73-362; R730.23 [文献标志码] A

Construction of three recombinant lentiviruses containing apoptin driven by survivin promoter of different lengths and comparison of their tumor suppressing efficency *in vitro*

Ye Feng[1], Zhong Bo[1,2], Dan Guorong[1], Jiang Fan[1], Sai Yan[1], Zhao Jiqing[1], Sun Huiqin[3], Liang Houjie[2], Zou Zhongmin[1] ([1]Institute of Toxicology, [3]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, College of Preventive Military Medicine, [2]Department of Oncology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To construct the recombinant lentivirus vectors using 3 survivin gene promoters (pSur) with a different length expressing 6 his-tagged apoptin cDNA and observe their tumor-suppressing effect after they were packed and human rectal cancer cells (SW480) were infected with them. **Methods** Three survivin gene promoters at a length of 160, 270 and 987 bp expressing 6 his-tagged apoptin cDNA were cloned and linked to the pMD18-T vector on which survivin gene promoters and apoptin gene were assembled. The assembled expression box was constructed into the lentivirus vector FG12 modified with polyA. Recombinant lentiviruses were packed using the 3-plasmid packaging system. Tumor-suppressing effect of recombinant lentivirus vectors on SW480 cancer cells was observed while apoptosis and cell cycle of SW480 cancer cells were detected by Annexin V-PE/7-AAD and flow cytometry on days 5 and 30 after SW480 cancer cells were infected with recombinant lentiviruses at an optimal MOI. **Results** The 3 recombinant lentivirus vectors were successfully constructed, and high titer lentiviruses were obtained after they were packed and concentrated. The infection rate of target cells for the purified lentivirus was over 80%. *In vitro* examination showed that the SW480 cancer cells expressed the apoptin protein with apoptosis or necrosis occurred on day 30 after they were infected with recombinant lentivirus. The tumor suppressing effect of recombinant lentivirus containing the 270 bp survivin promoter was more significant. **Conclusion** Recombinant lentivirus constructed with the 270 bp

[基金项目] 重庆市自然科学基金(CSTC2007BA5011)
* 同等贡献者
[通信作者] 邹仲敏,E-mail:zouzhmin@yahoo.com
梁后杰,E-mail:lianghoujie@sina.com

survivin promoter driving apoptin expression in target cells shows a rather good tumor-suppressing effect on human rectal cancer.

[**Key words**] apoptin gene; lentivirus vector; sruvivin promoter; tumor specificity

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2007BA5011). Ye Feng and Zhong Bo are the first author who contributed equally to the artide. Corresponding authors: Zou Zhongmin, E-mail: zouzhmin@yahoo.com; Liang Houjie, E-mail: lianghoujie@sina.com

肿瘤治疗药物的应用前景不仅取决于其对肿瘤杀伤有效性,也倚重于抑瘤特异性。肿瘤特异性药物具有可系统给药及可以加大给药剂量等优点。随着基因工程技术的发展,一批具有肿瘤特异性作用的杀伤蛋白[1-2]和启动子[3]的发现及应用让这种设想变为可能。其主要策略是通过构建病毒载体并感染正常及肿瘤细胞,病毒携带的编码基因将只在靶细胞内发挥作用从而达到特异性抑瘤效果。较常用的病毒载体有腺病毒、禽类病毒、逆转录病毒、慢病毒等。其中慢病毒具有高感染效率,可以感染分裂及非分裂细胞,在宿主内稳定表达以及低免疫活性等特点,是一种非常有希望的基因治疗载体[4]。诸多临床前研究[5-6]报道证实了其安全性和有效性。本研究应用具有肿瘤特异性杀伤的 Apoptin 蛋白基因以及 3 个不同片段长度(160、270、987 bp)能在肿瘤特异性表达的 survivin 基因启动子(survivin gene promoter, pSur),将其移入具有高安全性的第 2 代 SIN(self-inactivating)慢病毒载体——FG12,并通过包装纯化得到能高效感染细胞的高滴度重组病毒,以初步探讨其体外抑瘤效果。

1 材料与方法

1.1 主要材料

质粒小抽试剂盒(博日),凝胶回收试剂盒、纯化试剂盒(天根公司),T_4 Ligase、高保真 PCR 酶、DL 2000、DL 15 000、限制性内切酶(TaKaRa),DMEM 高糖培养液(Gibco 公司),100×青霉素-链霉素、小鼠来源 his-tag 一抗、山羊抗小鼠 HRP 二抗(碧云天公司),小牛血清(四季青公司),Annexin V-PE/7-AAD 细胞凋亡检测试剂盒(南京凯基公司),细胞转染试剂 Trans-EZ(SunBio 公司,上海),Opti-MEM(Invitrogen 公司),大肠杆菌感受态菌 DH5α、T-pSur 重组质粒、慢病毒包装细胞 293FT、人结肠癌细胞株 SW480、慢病毒质粒 FG12、包装质粒 pMDLg/pRRE、辅助质粒 pHCMVG(军事预防医学院毒理学研究所保存)。

1.2 重组慢病毒构建及包装

1.2.1 Apoptin-6×his cDNA 扩增 由于未见有商品化的 Apoptin 抗体,我们对 Apoptin 基因 PCR 引物进行了 6×his-tag 修饰。以 T-Apoptin 载体(北京农林研究院杨兵研究员惠赠)为模板,上游引物序列为:5′-TGGCGGCCGCGGCATGAACGCTCTCCAAGAAG-3′(下划线为 *Not* Ⅰ酶切位点);下游引物序列为:5′-CAGATCTAGAATTA***ATGGTGATGGTG***ATGATGCAGTCTTATACACCTTCT -3′(下划线为 *Xba* Ⅰ酶切位点,加粗及斜体处为 6×his-tag);反应体系为 50 μl,扩增条件为 95 ℃×3 min,94 ℃×45 s,56 ℃×45 s,72 ℃×45 s,27 个循环,72 ℃延伸 5 min。PCR 产物经 T/A 克隆后插入到 PMD-18T 载体,连接产物转化 DH5α 细菌,挑取单个菌落,过夜培养后提取质粒并进行测序鉴定。正确产物命名为 T-ApoH。

1.2.2 在 T 载体上连接 Survivin 启动子和 Apoptin-6×his *Not* Ⅰ和 *Xba* Ⅰ双酶切 T-ApoH 和已构建的插入 survivin 基因启动子的 T-160pSur、T-270pSur 和 T-987pSur 载体[7],分别回收 Apoptin-6×his 片段和线性化的 T-160pSur、T-270pSur 和 T-987pSur 载体,用 T_4 连接酶将 Apoptin-6×his 片段连接于 survivin 启动子下游。连接产物转化 DH5α 细菌,挑取单个菌落,过夜培养后提取质粒并进行双酶切鉴定。正确产物命名为 T-987pSur-ApoH、T-270pSur-ApoH 和 T-160pSur-ApoH。

1.2.3 慢病毒载体多克隆位点处引入 SV40 polyA 为增加重组慢病毒表达的 mRNA 的稳定性,在慢病毒载体 FG12 多克隆位点处引入 SV40 polyA。合成 2 条互补的 SV40 polyA oligoDNA 单链,序列为 PolyA-S:5′-***CTAGA***GGATCCAATAAAGGATCTTTTATTTTCATTGGATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTATA-3′(加粗及斜体处为 *Xba* Ⅰ黏性末端,下划线为 *Bam*H Ⅰ酶切位点),PolyA-AS:5′-***CTAG***TATACAAAAAACCAACACACAGATCCAATGAAAATAAAAGATCCTTTATTGGATCCT-3′(加粗及斜体处为 *Xba* Ⅰ黏性末端)。两条单链退火后两端形成与 *Xba* Ⅰ黏性末端匹配的黏性末端,连接到 *Xba* Ⅰ线性化的 FG-pSur-ApoH 载体,连接后 PolyA 片段 3′端 *Xba* Ⅰ的酶切位点消失,5′端的 *Bam*H Ⅰ和 *Xba* Ⅰ保留。连接产物转化 DH5α 细菌,挑取单个菌落,提取质粒并进行酶切鉴定。正确产物命名为 FG12-polyA。

1.2.4 Survivin 启动子驱动 Apoptin-6×his 表达盒转入慢病毒 FG12-polyA *Xho* Ⅰ和 *Xba* Ⅰ从 T-160pSur-ApoH、T-270pSur-ApoH 和 T-987pSur-ApoH 质粒上切下 survivin 启动子和 Apoptin 联合片段,连接到 *Xba* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ线性化的 FG12-polyA。连接产物转化 DH5α 细菌,挑取单个菌落,提取质粒并进行酶切鉴定。正确产物分别命名为 FG-987pSur-ApoH、FG-270pSur-ApoH 和 FG-160pSur-ApoH。

1.2.5 重组慢病毒的包装及纯化 利用 Qin 等[8]报道的 3 质粒包装系统在 293FT 细胞中包装病毒。瞬时转染试剂采用 TransEZ(Sunbio),载体质粒、包装质粒 pMDLg/pRRE、辅助质粒 pHCMVG 三者共转染时用量比为 4∶3∶1(质量比)。病毒液过滤收集后采用超速离心法浓缩使其达到高滴度[9]。病毒分别命名为 Lenti-FG160AH、Lenti-FG270AH、Lenti-FG987AH。

1.2.6 病毒滴度测定 参照文献[10]测定病毒滴度。

1.3 3 种慢病毒抑瘤效果差异比较

1.3.1 慢病毒感染实验 取对数生长期细胞接种于 6 孔板,培养 24 h 待其融合达 30%~50%,调整慢病毒用量以最适 MOI 值(含 8 μg/ml polybrene)感染细胞。感染后 24 h 换新鲜培养基,第 5 天倒置荧光显微镜下观察感染效率。

1.3.2 Western blot 检测 Apoptin-6×his 表达 利用 RIPA 强

裂解液制备总蛋白,经 BCA 蛋白质浓度测定试剂盒(碧云天)定量后以等量的总蛋白于 15% SDS-PAGE 上样进行电泳。小鼠来源 his-tag 与兔源 actin 一抗分别为碧云天和 Boston 公司产品,山羊抗小鼠,山羊抗兔辣根过氧化物酶二抗均购自碧云天。

1.3.3 Annexin V-PE/7-AAD 检测细胞凋亡/坏死 为观察慢病毒感染细胞后短期和长期效应,设置感染后第 5 天和第 30 天进行凋亡测定,操作按照说明书严格执行。7-AAD 特异的与坏死/凋亡细胞核结合,并在激光激发下发出红色荧光,明亮的为坏死细胞,微弱的的为中/晚期凋亡细胞。Annexin V-PE 可与早期凋亡细胞膜特异结合,激光激发下仅见胞膜有橙红色荧光。

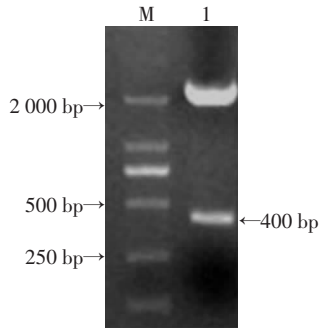
1.3.4 流式细胞仪分析细胞周期变化 收集慢病毒感染后第 5 天和第 30 天细胞,按常规方法消化离心细胞,0.01 mol/L PBS 洗 2 次,收集并调整至 1×10^7 个细胞的单细胞悬液,70% 冰乙醇 4 ℃过夜固定。加入碘化丙啶(PI,50 mg/L),流式细胞仪分析细胞周期。该实验重复 3 次。

2 结果

2.1 成功构建 3 种重组慢病毒质粒

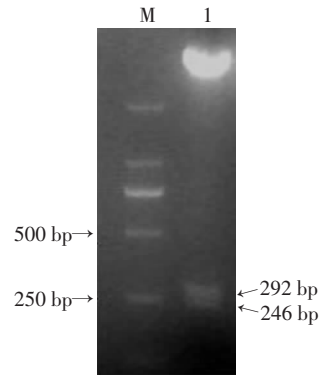
2.1.1 6×his 标签修饰 Apoptin 及重组质粒构建 穿梭质粒 T-ApoH 经双酶切后电泳出现约 400 bp 目的片段(图 1),对质粒测序证实包含的 Apoptin 基因序列与 GenBank 中的序列一致,并且其 3′端成功修饰上 6×his 标签。Apoptin-6×his 随后被亚克隆于不同 T-pSur 质粒的 pSur 下游,经双酶切及测序鉴定 3 种重组质粒均构建正确(图 2)。

2.1.2 polyA 修饰慢病毒载体及表达盒移入 polyA 修饰慢病毒载体经双酶切后电泳下部出现的两个小片段用于鉴定合成的 polyA 片段插入方向,292 bp + 246 bp 为正向插入,353 bp + 185 bp 为反向插入。反向插入的 polyA 由于不能正确表达会影响转录出的 mRNA 稳定性。图 3 示 polyA 正向插入产物双酶切结果。将表达盒于 T-pSur 质粒穿梭质粒切下后连接在 polyA 正向插入的重组慢病毒载体 FG12-polyA 中,双酶切鉴定 3 种重组慢病毒构建成功(图 4)。



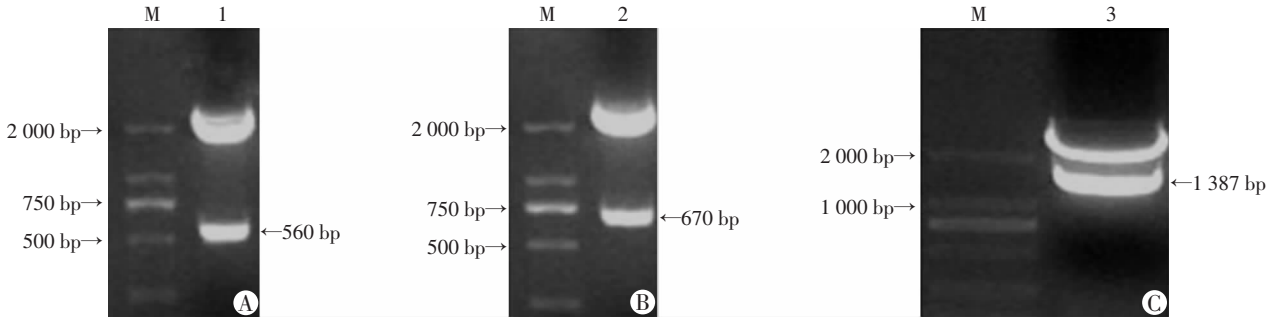
M:标准;1:T-ApoH

图 1 *Not* Ⅰ/*Xba* Ⅰ 双酶切鉴定穿梭质粒 T-ApoH



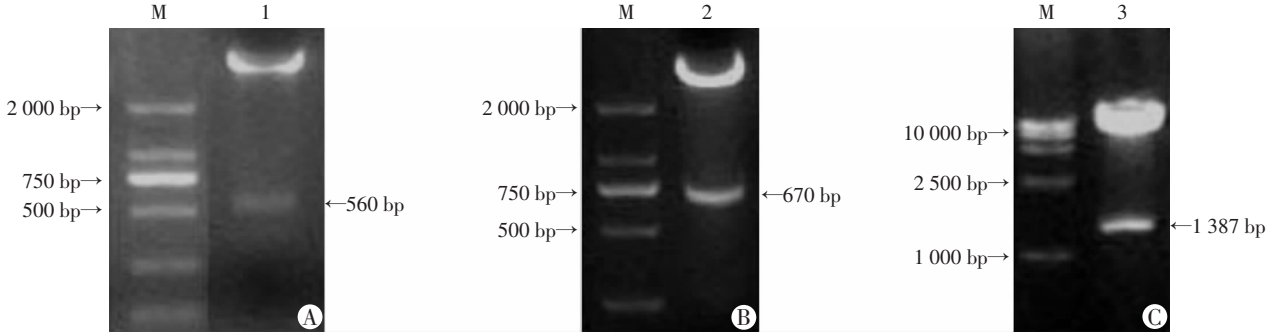
M:标准;1:FG12-polyA

图 3 PolyA 修饰慢病毒载体 FG12-polyA *Xba* Ⅰ/*Pst* Ⅰ 双酶切鉴定



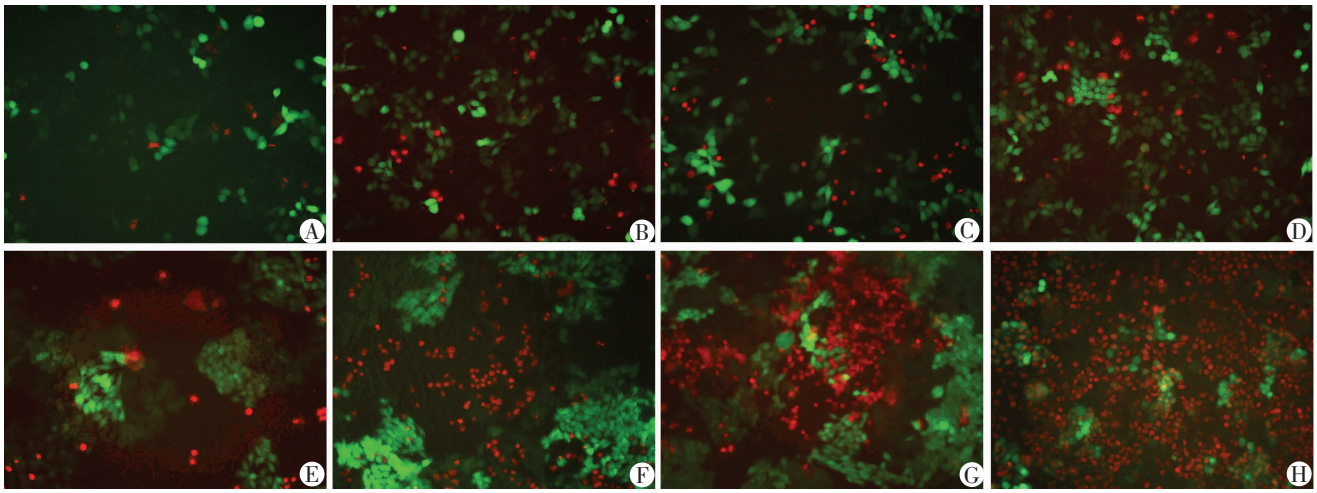
M:标准;1:T-160pSur-ApoH; 2:T-270pSur-ApoH; 3:T-987pSur-ApoH

图 2 *Xba* Ⅰ/*Xho* Ⅰ 双酶切鉴定穿梭质粒 T-160pSur-ApoH(A)、T-270pSur-ApoH(B)、T-987pSur-ApoH(C)



M:标准;1:FG-160pSur-ApoH; 2:FG-270pSur-ApoH; 3:FG-987pSur-ApoH

图 4 *Xba* Ⅰ/*Xho* Ⅰ 双酶切鉴定重组慢病毒质粒 FG-160pSur-ApoH(A)、FG-270pSur-ApoH(B)、FG-987pSur-ApoH(C)



A～D:第5天;E～H:第30天;A、E:Lenti-FG12;B、F:Lenti-FG160AH;C、G:Lenti-FG270AH;D、H:Lenti-FG987AH

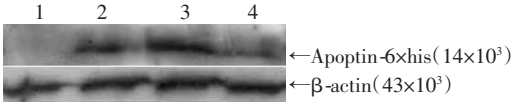
图6 重组慢病毒感染SW480后第5天及第30天细胞凋亡/坏死变化 (倒置荧光显微镜 ×200)

2.2 重组慢病毒滴度测定及感染效率观察

经包装并浓缩后,3种重组慢病毒Lenti-FG160AH、Lenti-FG270AH、Lenti-FG987AH和空病毒FG12的滴度分别为3×10^6、2×10^6、3.5×10^6 TU/ml和1.45×10^6 TU/ml,病毒滴度较未浓缩前提高了50～100倍。以不同剂量病毒感染SW480细胞,5 d后于倒置荧光显微镜下观察感染效率并计算得出感染复数(MOI)=20为最适MOI。

2.3 SW480细胞感染重组慢病毒后Apoptin-6×his表达水平的检测

各病毒以最适MOI感染SW480细胞,第5天荧光镜下见大于80%的细胞呈现绿色荧光。阳性病毒感染组在2个时间点(第5天和第30天)Western blot均测得14×10^3的Apoptin-6×his特异条带,其中仅见感染后第5天各组蛋白表达明显差异,270 bp pSur显示出更强的活性(图5)。由于pSur活性具有G_2/M期特异性,感染后第5天细胞凋亡/坏死数较少(图6),增殖明显,选择该时相点的Apoptin-6×his表达有利于反映真实的pSur活性。

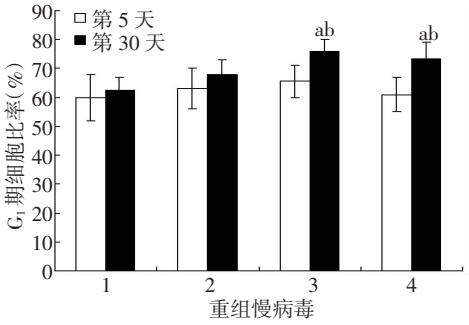


1:Lenti-FG12; 2:Lenti-FG987AH; 3: Lenti-FG270AH; 4: Lenti-FG160AH

图5 不同慢病毒感染SW480细胞第5天Apoptin-6×his表达

2.4 体外实验比较病毒对细胞凋亡及周期影响

由于早期凋亡细胞膜荧光微弱,本实验中不宜察觉,而中、晚期凋亡/坏死细胞明显。病毒感染后第5天仅少部分细胞为凋亡/坏死状态(图6),同时相点细胞周期结果显示,不同慢病毒感染组间G_1期占细胞周期比率没有差异($P>0.05$,图7)。在感染后第30天,凋亡和坏死细胞增加,细胞周期显示Lenti-FG270AH和Lenti-FG987AH明显的导致G_1期增加($P<0.05$,图7),说明部分肿瘤细胞增殖受到抑制。以上结果提示重组慢病毒诱导肿瘤细胞凋亡不是急性发生的,而是随时间延长细胞凋亡效应愈明显。此外,我们观察到处于凋亡/坏死期细胞鲜见绿色荧光,这可能与此状态细胞绿色荧光蛋白表达关闭或受到抑制有关。



1: Lenti-FG12; 2: Lenti-FG160AH; 3: Lenti-FG270AH; 4: Lenti-FG987AH a:$P<0.05$,与第5天比较;b:$P<0.05$,与Lenti-FG12比较

图7 重组慢病毒感染SW480后第5天与第30天SW480细胞周期变化

3 讨论

Apoptin是最早发现的具有泛肿瘤特异性杀伤的功能蛋白,其来源于鸡贫血病毒,相对分子质量为13.6×10^3。已证实其以非p53依赖性途径诱导细胞凋亡,并且不受bcl-2的抑制作用,能为对放疗、化疗产生耐受的肿瘤提供新的治疗途径,是一种理想的肿瘤基因治疗药物。Apoptin的肿瘤特异性与其细胞内定位及磷酸化有关,在正常二倍体细胞Apoptin呈非磷酸化状态分布于细胞质,而在肿瘤及转化细胞中,Apoptin通过核定位系统或穿梭系统聚集于核内,磷酸化后通过与DEDAF、Nur77、Nmi、Hippi等蛋白相互作用,生成多种凋亡信号激活下游凋亡通路,其中线粒体损伤是凋亡主要原因[11-12]。

以往研究多将Apoptin联合CMV等强启动子联合构建入腺病毒和禽类病毒等病毒载体,高表达的作用蛋白在数天内即取得了显著的抑瘤效果[13-15]。但受限于病毒感染效率和载体上基因不能持续表达的影响,长期观察表明,逃过感染及感染后存活下来的细胞可以继续增殖,影响治疗效果[14]。慢病毒在感染效率

和持续表达上有独特的优势,在基因治疗的研究中也显示出了良好的效果。我们选用了将 Apoptin 构建入慢病毒载体 FG12 中,并依靠泛肿瘤特异性 survivin 基因启动子选择性表达以提高其肿瘤特异性。其他实验中证实了所构建的重组慢病毒具有肿瘤特异性,因在被其感染的正常细胞中检测不到 Apoptin 蛋白表达。本研究未使用高活性的启动子,如 CMV 等,是考虑其普遍缺乏肿瘤特异性,若应用于慢病毒则正常细胞感染后会长期高量表达目的蛋白,该作用可随受感染的宿主细胞分裂传递给子代细胞。虽然有报道称 Apoptin 对正常细胞没有明显的副作用,但外源蛋白的长期大量表达依旧可能导致诸多的风险。活性较低但具有肿瘤特异性的启动子应用于慢病毒载体中有更高的安全性,且在宿主长期表达的累积作用也可弥补其活性较低的不足。

Apoptin 蛋白的凋亡效应与其在肿瘤细胞中的含量成正比[16],高活性的启动子可以驱动更多目的蛋白表达以提高肿瘤的治疗效果。Li 等[17]报道 pSur 的转录活性基本区为 250 bp,对其分析表明有数个与启动子活性相关的顺式作用元件,包括 sp1 结合位点,CDE 及 CHR 有关,后者还与 pSur G_2/M 周期特异性表达有关。Xu 等[18]在 Hela 细胞中对数个启动子活性鉴定比较显示,269 bp 活性高于长片段启动子(987 bp)和短片段启动子(158 bp),后者缺少数个 sp1 结合位点及 1 个 CDE。以其为基础,我们选择了 3 个不同片段长的 survivin 启动子(160、270、987 bp),用以驱动目的基因。在重组慢病毒感染 SW480 后第 5 天即可观察到大部分细胞表达绿色荧光蛋白,Western blot 结果显示 270 bp pSur 活性最高,能够诱导表达更多的Apoptin 蛋白,这说明 270 bp pSur 在慢病毒载体 FG12 中依旧保持较高活性。我们之前利用 pMIR-Report 系统在 293FT 中测定启动子活性发现 270 bp 较 160 bp 和 987 bp 低,可能是由于多余的 T 载体构建入系统中影响了 survivin 启动子活性。

体外抑瘤实验显示重组慢病毒感染早期(感染后第 5 天),肿瘤细胞凋亡/坏死不明显,感染后第 30 天观察,凋亡/坏死细胞数量明显增多。该结果与强启动子应用后短期即可导致显著的抑瘤效应较为不同[14-15],主要是由于使用的天然 pSur 片段的活性相对较低,肿瘤细胞对感染后初期胞内低水平表达的 Apoptin 表现出一定的耐受。随着时间增加,Apoptin 在宿主及子代细胞中持续表达并累积达到较高的水平,显现出杀伤效果。细胞周期结果进一步显示 Lenti-FG270AH 和 Lenti-FG987AH 两种重组慢病毒在 SW480 被感染后第 30 天能显著阻滞感染细胞于 G_1 期,Lenti-FG160AH 感染细胞 G_1 期变化不明显可能因为启动子活性较低导致 Apoptin 表达量不够。综合启动子活性比较结果,我们认为 Lenti-FG270AH 对 SW480 可能有更显著的凋亡效应。文献[2]报道 Apoptin 可以通过 APC/C 复合物作用引起细胞阻滞于 G_2/M 期并引起随后凋亡效应,但本实验中未观察到此效应,可能与载体选择及 Apoptin 作用水平有关。

本研究成功构建并获得了 3 种含有不同 pSur 启动子驱动 Apoptin 表达的重组慢病毒,并在 SW480 细胞中比较了启动子活性差异及诱导肿瘤细胞凋亡作用,为提高肿瘤基因治疗的安全性作出了有益的探索。

参考文献:

[1] Bruno P, Brinkmann C R, Boulanger M C, *et al*. Family at last: highlights of the first international meeting on proteins killing tumour cells [J]. Cell Death Differ, 2009, 16(1): 184-186.
[2] Noteborn M H. Proteins selectively killing tumor cells[J]. Eur J Pharmacol, 2009, 625(1/3): 165-173.
[3] Toscano M G, Romero Z, Munoz P, *et al*. Physiological and tissue-specific vectors for treatment of inherited diseases[J]. Gene Ther, 2011, 18(2): 117-127.
[4] Kohn D B. Lentiviral vectors ready for prime-time[J]. Nat Biotechnol, 2007, 25(1): 65-66.
[5] Levine B L, Humeau L M, Boyer J, *et al*. Gene transfer in humans using a conditionally replicating lentiviral vector[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(46): 17372-17377.
[6] D'Costa J, Mansfield S G, Humeau L M. Lentiviral vectors in clinical trials: Current status[J]. Curr Opin Mol Ther, 2009, 11(5): 554-564.
[7] 钟波, 叶枫, 王涛, 等. 不同活性的 survivin 基因启动子片段的克隆及鉴定[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(11): 1115-1118.
[8] 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.
[9] Reiser J. Production and concentration of pseudotyped HIV-1-based gene transfer vectors[J]. Gene Ther, 2000, 7(11): 910-913.
[10] 钱倩, 王晓通, 谢玉波, 等. Cdx2 基因 RNA 干扰慢病毒载体的构建与鉴定[J]. 世界华人消化杂志, 2010, 18(3): 245-249.
[11] Los M, Panigrahi S, Rashedi I, *et al*. Apoptin, a tumor-selective killer[J]. Biochim Biophys Acta, 2009, 1793(8): 1335-1342.
[12] Backendorf C, Visser A E, de-Boer A G, *et al*. Apoptin: therapeutic potential of an early sensor of carcinogenic transformation[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2008, 48: 143-169.
[13] Li X, Jin N, Mi Z, *et al*. Antitumor effects of a recombinant fowlpox virus expressing Apoptin *in vivo* and *in vitro*[J]. Int J Cancer, 2006, 119(12): 2948-2957.
[14] van-der-Eb M M, Pietersen A M, Speetjens F M, *et al*. Gene therapy with apoptin induces regression of xenografted human hepatomas[J]. Cancer Gene Ther, 2002, 9(1): 53-61.
[15] Pietersen A M, van-der-Eb M M, Rademaker H J, *et al*. Specific tumor-cell killing with adenovirus vectors containing the apoptin gene [J]. Gene Ther, 1999, 6(5): 882-892.
[16] Guelen L, Paterson H, Gaken J, *et al*. TAT-apoptin is efficiently delivered and induces apoptosis in cancer cells [J]. Oncogene, 2004, 23(5): 1153-1165.
[17] Li F, Altieri D C. Transcriptional analysis of human survivin gene expression[J]. Biochem J, 1999, 344 Pt 2: 305-311.
[18] Xu R, Zhang P, Huang J, *et al*. Sp1 and Sp3 regulate basal transcription of the survivin gene[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 356(1): 286-292.

(收稿:2011-09-15;修回:2011-10-25)
(编辑 吴培红)