

• 技术与方法 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.01.026

慢病毒载体靶向介导 *p66shc* 基因沉默*

张 婵,董文斌[△],赵 帅,李清平,康 兰,雷小平,郭 琳,翟雪松
(泸州医学院附属医院新生儿科,四川泸州 646000)

摘要:目的 构建 *p66shc* 基因重组慢病毒表达载体,并将之转染至 293T 细胞,通过 RNA 干扰致使 *p66shc* 基因沉默,为进一步研究 *p66shc* 基因功能奠定基础。方法 筛选 3 个 RNA 靶点,命名为 *p66shc-shc1*、*p66shc-shc2*、*p66shc-shc3*,与双酶切后的 pLenR-绿色荧光蛋白(GFP)(含有 GFP 表达)连接,转化入感受态的 DH5 α 细胞,挑取阳性克隆测序正确后,与 pRsv-REV、pMDlg-pRRE、pMD2G 一起转染 293T 细胞,于倒置荧光显微镜下检测 GFP 的表达,证实病毒包装成功。使用荧光定量 PCR 及 Western blot 技术检测 *p66shc* 在基因及蛋白水平的表达,选取有效沉默 *p66shc* 基因的 *p66shc-shc1* 靶点,为后续试验做准备。结果 成功构建表达 *p66shc* 的 shRNA 慢病毒载体并转染至真核生物细胞内,通过荧光定量 PCR 及 Western blot 技术检测其通过 RNA 干扰导致细胞内 *p66shc* 基因沉默。结论 靶向表达 *p66shc* 的 shRNA 慢病毒载体,转染入真核生物细胞内可通过 RNA 干扰在分子及蛋白水平导致 *p66shc* 基因沉默。

关键词:慢病毒属;RNA 干扰;*p66shc*

中图分类号:K373

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2015)01-0073-03

Study on lentiviral vector target inducing *p66shc* gene silencing*

Zhang Chan, Dong Wenbin[△], Zhao Shuai, Li Qingping, Kang Lan, Lei Xiaoping, Guo Lin, Zhai Xuesong

(Department of Newborn Medicine, Affiliated Hospital, Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract: Objective To construct *p66shc* gene interfering lentivirus vectors recombination and transfect it to 293T cells, RNA interfering was carried out to induce *p66shc* gene silence, so as to provide basis for further study of the *p66shc* function. **Methods** Screening of three RNA targets which were named after *p66shc-shc1*, *p66shc-shc2*, *p66shc-shc3*, cloned into the pLenR - GFP vector, which contained green fluorescent protein(GFP) and transformed into DH5 α cells. The positive clone were picked out for right sequencing and transfected to 293T cells with pRsv-REV, pMDlg-pRRE, pMD2G. The expression of GFP in inverted fluorescence microscope confirmed the virus packaging success. Fluorescence quantitative PCR and Western blot technology were used to investigate the expression of *p66shc* at the molecular and protein levels, *p66shc-shc1* target of effective silencing *p66shc* gene was selected to prepare for subsequent tests. **Results** The shRNA lentivirus vector was constructed which could express *p66shc* and was transfected into 293T cells successfully. Fluorescence quantitative PCR and Western blot technology were used to investigate *p66shc* gene silence by RNA interference. **Conclusion** The lentivirus RNAi vector of targeted expression *p66shc* could induce *p66shc* gene silence at the molecular and protein levels after transfected into 293T cells by RNA interference.

Key words: lentiviral vector; RNA interference; *p66shc*

氧疗在新生儿尤其是早产儿急救医学中是必不可少的,长时间高浓度和(或)高压氧气吸入常常导致肺部氧化应激损伤,但其确切机制至今仍未完全阐明。作者的前期研究表明,*p66shc* 参与的氧化应激通路在其发病机制中占重要位置^[1]。*p66shc* 是哺乳动物生命周期相关蛋白,也是近年来研究细胞氧化应激的主要蛋白之一,它通过线粒体内氧化细胞色素 C 产生大量活性氧(ROS)导致细胞氧化损伤^[2]。本研究拟构建靶向介导 *p66shc* 基因的重组慢病毒表达载体,并将之转染至 293T 细胞,通过 RNA 干扰(RNAi)导致 *p66shc* 基因沉默,为进一步研究 *p66shc* 基因功能及其与高氧肺损伤的关系奠定基础,为临床治疗高氧肺损伤提供新的实验室依据。

1 材料与方 法

1.1 材料 pLenR-GPH Vector、DL2 000 ladder Marker、荧光定量 PCR 试剂、sybr green I、荧光定量 PCR 引物、DEPC 购自 Western Biotechnology 公司、BamH I、EcoR I、Kpn I 购自 Takara 公司;T4 DNA 连接酶、T4 DNA 连接酶缓冲液购自 NEB 公司;BSA 购自 Sigma 公司,引物由上海生工生物工程有

限公司合成;NucleoBond Xtra Midi Plus 引物购自 Macherey-Nagel 公司;AxyPrep 质粒小量制备试剂盒购自 Axygen 公司;高效感受态细胞制备试剂盒购自 Sagon 公司;包装细胞 293T 细胞株购自中科院上海细胞所;大肠杆菌菌株 DH5 α 购自 Invitrogen 公司;蛋白裂解液购自北京普利莱公司;一抗 *p66shc* 购自 Abcam 公司;预染蛋白 marker 购自 Fermentas 公司;HRP 二抗、内参一抗购自 GenScript 公司;荧光定量 PCR 仪购自 FTC2000 公司;测序仪购自 Invitrogen 公司;稳压 DNA 电泳仪购自 BioRad 公司;凝胶成像仪购自博迅仪器公司;荧光倒置显微系统购自 Leica 公司。

1.2 方 法

1.2.1 LV-shRNA 载体的构建及其鉴定 针对 *p66shc* 基因序列(NM-183001.4),利用 siRNA 设计程序按照 RNAi 序列设计原则,设计多个 RNAi 靶点序列,根据设计软件进行评估测定,选定 3 个最佳的动力学参数靶点,基因序列为:*p66shc-shc1*:5'-CCG CTT TGA AAG TGT CAG TCA-3',*p66shc-shc2*:5'-TCA GCT ACC ACA TGG ACA ATC-3',*p66shc-*

* 基金项目:中华儿科杂志第二届双鹤珂立苏科研基金;四川省教育厅科研基金(08ZA150);四川省卫生厅科研基金(90191)。作者简介:张婵(1987-),硕士,住院医师,主要从事新生儿疾病的基础与临床研究工作。△ 通讯作者,Tel:13518389718;E-mail:DongWenbin2000@163.com。

shc3;5'-CCG CTT TGA AAG TGT CAG TCA-3'。由金瑞斯生物合成含干扰序列的双链 DNA oligo,其两端含有 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切位点黏端,经退火形成双链 DNA。将 pLenR-绿色荧光蛋白(GFP)载体(该载体中含有 EF1- α 启动子调控的 GFP 表达)用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切成线性,1%琼脂糖电泳呈阳性,胶回收后,与合成的双链 DNA 连接,转化入感受态的 DH5 α 细胞^[3],挑取阳性克隆并提取质粒,经 *Kpn* I 和 *Eco*R I 双酶切鉴定正确后送华大基因公司测序鉴定。

1.2.2 慢病毒的包装 用胰蛋白酶消化对数生长期的 293T 细胞,细胞密度为 0.5×10^9 个/L 时,重新接种于 25 mL 的 15 cm 细胞培养皿,37 °C,50 mL/L CO₂ 培养箱内培养。制备慢病毒包装系统中 4 种质粒 DNA 溶液。加入无菌水定容至 1 800 μ L,再加入 CaCl₂ (2.5 mol/L) 溶液 200 μ L,混匀,加入 2 \times BBS 溶液 2 000 μ L,室温放置 20~30 min。当细胞密度达 60%~70% 时转染。将 DNA 和磷酸钙混合液转移至含单层细胞的培养液中,混匀,培养 12 h 后弃培养液,PBS 冲洗,重复 3 次。每瓶细胞中加入含 100 mL/L 小牛血清的细胞培养液 15 mL,继续培养 48 h。再继续培养 24 h 后离心收集病毒上清液,将上清液以 0.45 μ m 滤器过滤,25 000 r/min 离心 20 min。而后以冰 PBS 液分别溶于 500 μ L DMEM 和 500 μ L PBS 重旋病毒沉淀于 4 °C 溶解过夜。次日于倒置荧光显微镜下检测 GFP 表达量,并使用逐孔稀释滴度测定法测定慢病毒滴度。

1.2.3 荧光定量 PCR 检测干扰效率 收集 293T 细胞,1 000 r/min 离心 5 min,去上清液,细胞沉淀中加入 1 mL TRIzol,轻轻吹打后室温静置,转移至新的 1.5 mL EP 管中。加入 200 μ L 三氯甲烷,剧烈混匀,室温静置 2~3 min,离心,吸取上清液,加入等体积预冷的异丙醇,室温静置 10 min,离心弃上清液,每管加入 1 mL 75% 乙醇润洗,离心弃上清液,加入 RNase-free 水至完全溶解,抽提的 RNA 经反转录得到 cDNA,设计特异性的引物序列(5'-GCA GGA CTC GGG TGG AAG-3')和绿色荧光染料进行荧光定量 PCR 检测。

1.2.4 Western blot 检测 p66shc 蛋白表达 培养细胞去除培养液悬浮细胞,离心收集,冰上放置数分钟,1 200 r/min 离心 5 min,取上清液,考马斯亮蓝 G250 测定蛋白浓度。取一定量蛋白样品行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),将蛋白样品转移到 PVDF 膜上,取出膜,并做好正反面标记,在 TBST 中清洗 1 min,然后用封闭液封闭。用封闭液将对应的一抗稀释(1:500),内参一抗稀释(1:3 000),然后温育 1.5 h。用 TBST 清洗 3 次,每次 5 min。用封闭液将二抗稀释(1:5 000),温育 1.5 h。化学发光、显影、定影,用 UVP 凝胶图象处理系统 Labworks4.6 软件分析目的条带的灰度值。

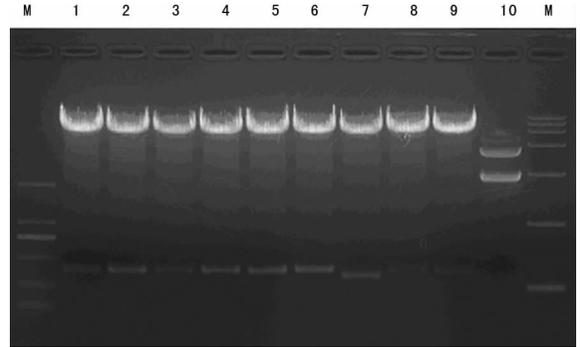
1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析或 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 LV-shRNA 载体的鉴定 挑取重组 LV-shRNA 载体阳性克隆,送至华大基因公司测序,测序结果表明阳性克隆序列正确,可包装病毒及靶点筛选。同时将重组质粒以限制性内切酶 *Kpn* I (位于 4 290 bp)和 *Eco*R I (位于 4 620 bp)进行酶切鉴定,行琼脂糖凝胶电泳,空载体酶切片段序列为 331 bp,shRNA 重组载体酶切序列为 331+61(或 65 bp)=392(或 396 bp),电泳结果显示阳性克隆条带位于 250~500 bp,与预期相符,LV-shRNA 载体构建成功,见图 1。

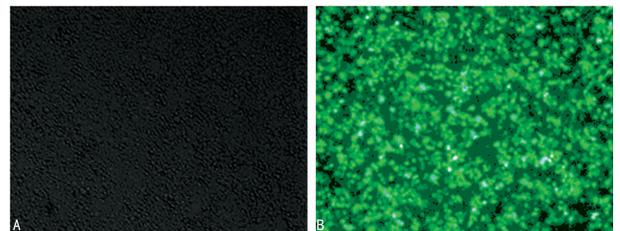
2.2 慢病毒的包装 将所构建的 p66Shc 重组质粒与 pRsv-

REV、pMDlg-pRRE、pMD2G 一起转染 293T 细胞,转染 24 h 后在荧光倒置显微镜下观察,每孔细胞均表达 GFP,转染成功,测定滴度,见图 2~4。



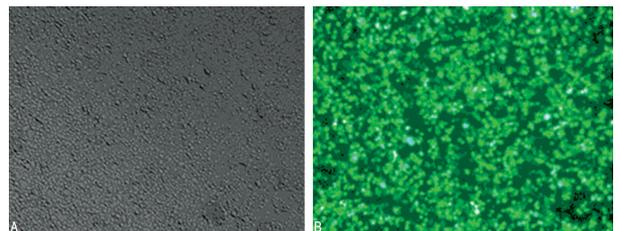
1~3:p66shc-shc1,均为阳性克隆;4~6:p66shc-shc2,均为阳性克隆;7:阴性对照,pLenR-GFP 慢病毒空质粒;8~10:p66shc-shc2,8、9 为阳性克隆;M:DNA 分子标记物。

图 1 酶切载体 DNA 琼脂糖凝胶电泳结果



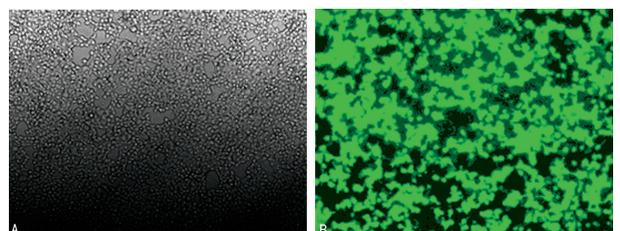
A:明场照片;B:荧光视野。

图 2 p66shc-shc1 转染 293T 细胞荧光倒置显微镜图片图($\times 200$)



A:明场照片;B:荧光视野。

图 3 p66shc-shc3 转染 293T 细胞荧光倒置显微镜图片图($\times 200$)

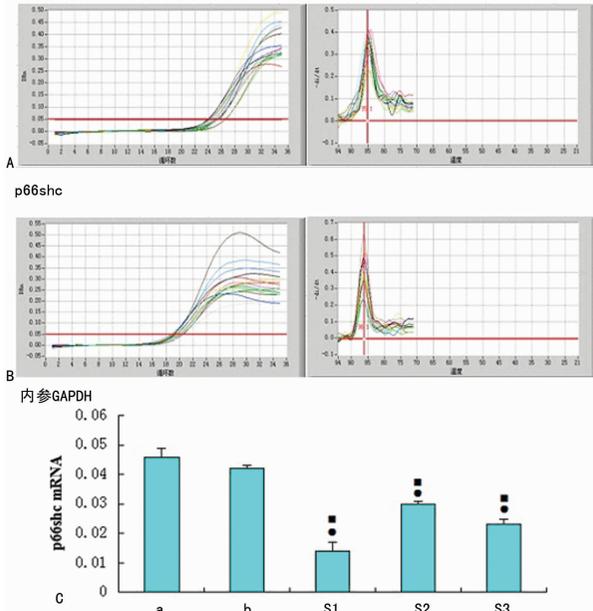


A:明场照片;B:荧光视野。

图 4 p66shc-shc3 转染 293T 细胞荧光倒置显微镜图片图($\times 200$)

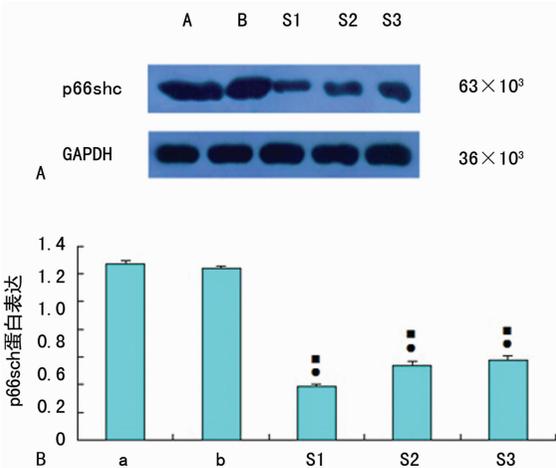
2.3 稳定沉默 p66Shc 基因真核细胞系的建立 连续培养 293T 细胞 1 个月,分别提取转染 p66Shc-pLenR-GFP 慢病毒的 293T 细胞及转染 pLenR-GFP 空载体慢病毒的 293T 细胞总 RNA,反转录得 cDNA,用 p66shc 引物和 GAPDH 引物做荧光定量 PCR。结果显示,与慢病毒空质粒感染的细胞相比,经 p66shc 慢病毒转染后的细胞 p66shc mRNA 表达量降低,p66shc-shc1 组下降最为明显,见图 5,并用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算数

据。使用 Western blot 检测转染后细胞的 p66shc 蛋白表达, 用 UVP 凝胶图象处理系统 Labworks4. 6 软件分析目的条带的灰度值, 将灰度值数据经过统计学分析做柱状图, 分析发现与慢病毒空质粒感染的细胞相比, 经 p66shc 慢病毒转染后的细胞, p66shc 蛋白的表达下降, p66shc-shc1 组下降最为明显, 见图 6, 表明本研究已经成功建立稳定沉默 p66shc 的 293T 细胞系, 并选取 p66shc-shc1 组进入后续实验。



A: p66shc 溶解曲线; B: 内参 GAPDH 溶解曲线; C: p66shc mRNA 表达分析图, 其中 a 为正常 293T 细胞, b 为慢病毒空质粒感染的 293T 细胞, S 为 p66shc 慢病毒感染的 293T 细胞, S1、S2、S3 分别为 p66shc-shc1、p66shc-shc2、p66shc-shc3。●: $P < 0.05$, 与正常 293T 细胞比较; ■: $P < 0.05$, 与慢性病毒空质粒感染的 293T 细胞比较。

图 5 荧光定量 PCR 检测 p66shc mRNA 的表达



A: Western blot 图; B: Western blot 分析图, 其中 a 为正常 293T 细胞, b 为慢病毒空质粒感染的 293T 细胞, S 为 p66shc 慢病毒感染的 293T 细胞, S1、S2、S3 分别为 p66shc-shc1、p66shc-shc2、p66shc-shc3。●: $P < 0.05$, 与正常 293T 细胞比较; ■: $P < 0.05$, 与慢性病毒空质粒感染的 293T 细胞比较。

图 6 Western blot 检测 p66shc 蛋白的表达

3 讨 论

p66shc 是一种控制 ROS 水平, 诱导细胞凋亡, 调控哺乳动物生命周期的基因^[4], 研究显示, 敲除 p66shc 基因的老鼠与健康老鼠比较, 寿命增加 30%, 对氧化应激损伤及增龄性病理变

化(如动脉粥样硬化)有更强的抵抗力^[5-8]。为研究其在细胞氧化应激、细胞凋亡及由此引起的器官损伤中的作用, 需在干扰靶细胞遗传特性的前提下沉默 p66shc 基因。RNAi 是指在进化过程中高度保守的、由双链 RNA 诱发的、同源 mRNA 高效特异性降解的现象, 是一种管理基因表达的重要工具, 对这一现象的深入研究能为某些人类疾病的治疗提供依据^[9-12]。其前提是拥有一种稳定、高效、安全的工具将外源基因(RNA 或 DNA)传入靶细胞内。核酸单体不能直接有效的进入到细胞核中, 需要如磷酸钙、脂质体、慢病毒等充当载体。其中, 慢病毒来源于逆转录病毒科, 能将 RNA 逆转录为 DNA^[13], 其种属特性为在不需裂解靶细胞的前提下将自身基因组整合入靶细胞的核 DNA 中^[14-15]。因此, 慢病毒载体成为最常用的基因转移载体, 同时, 慢病毒载体能稳定转染分裂期及非分裂期的细胞, 甚至干细胞, 并且较非病毒载体更安全、低毒^[16-18], 这些独一无二的特性使得慢病毒载体成为大部分细胞的高效基因转移载体。本研究成功构建了 p66Shc 慢病毒载体, 并稳定转染至真核细胞内, 导致 p66Shc 基因靶向沉默, 为进一步研究 p66Shc 基因的功能及其与高氧诱导新生儿肺损伤的关系奠定了基础, 相关研究正在进行中。

参 考 文 献:

- [1] 车忠丽, 董文斌, 李清平, 等. PKC β /p66Shc 氧化应激通路介导高氧诱导人肺泡上皮细胞凋亡的作用[J]. 临床儿科杂志, 2013, 31(11): 1066-1069.
- [2] Gertz M, Steegborn C. The lifespan-regulator p66Shc in mitochondria: redox enzyme or redox sensor[J]. Antioxid Redox Signal, 2010, 13(9): 1417-1428.
- [3] 张丽霞, 贾海燕. 一种简便高效大肠杆菌感受态细胞制备方法[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(12): 41-42.
- [4] Suski JM, Karkucinska-Wieckowska A, Lebidzinska M, et al. p66Shc aging protein in control of fibroblasts cell fate[J]. Int J Mol Sci, 2011, 12(8): 5373-5389.
- [5] Migliaccio E, Giorgio M, Mele S, et al. The p66shc adaptor protein controls oxidative stress response and Life span in mammals[J]. Nature, 1999, 402(6759): 309-313.
- [6] Menini S, Amadio L, Oddi G, et al. Deletion of p66Shc longevity gene protects against experimental diabetic glomerulopathy by preventing diabetes-induced oxidative stress[J]. Diabetes, 2006, 55(6): 1642-1650.
- [7] Camici GG, Schiavoni M, Francia P, et al. Genetic deletion of p66 (Shc) adaptor protein prevents hyperglycemia-induced endothelial dysfunction and oxidative stress [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(12): 5217-5222.
- [8] Rota M, Lecapitaine N, Hosoda T, et al. Diabetes promotes cardiac stem cell aging and heart failure, which are prevented by deletion of the p66shc gene[J]. Circ Res, 2006, 99(1): 42-52.
- [9] Davis ME, Zuckerman JE, Choi CH, et al. Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles[J]. Nature, 2010, 464(7291): 1067-1070.
- [10] Sashital DG, Doudna JA. Structural insights into RNA interference[J]. Curr Opin Struct Biol, 2010, 20(1): 90-97.
- [11] Rana TM. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs[J]. Nat Rev(下转第 83 页)

造成的拖延更严重^[6]。因此也可以说明大学生的拖延与学生的个性特质有着密切的关系^[7-9]。部分学生长期养成任何事情父母做决定的依赖思想,所以当自己要决定一件事情就非常困难,情绪上出现抵触、犹豫不决和焦躁不安,最终导致事情拖延^[10]。从难以决定、懒惰和紧张的角度还可以进一步解释护理学生在自我决定任务上的拖延现象。

3.3 护理大学生学习拖延影响因素 通过内外控制源对学习拖延的调查结果发现,外控型的学生在自我任务上的拖延更严重;外控型的学生在他人决定任务中认为拖延使问题的程度更严重;外控型的学生在自我决定任务中期望降低拖延更强烈。外控型与内控型的学生相比较,前者的拖延问题更多。其结果与其他研究结果一致,拖延行为与外控型呈正相关,与内控型呈负相关^[11-12]。因为外控者主要是迫于一种权威压力行事,缺乏主观积极性和自我良好的时间安排,做事喜欢一拖再拖,常常抱有一种侥幸心理。如果没有外在的约束,外控型的人较难按时完成任务,由于没有达到目标,外控型的人心理挫败感很强,他们也急切希望能够降低拖延状况。由于外控型的这种人格特质,他们的拖延会出现在各种类型的任务上,特别是在他人决定任务中,外在的要求和压力更大,外控型的人也会因为拖延事情,常常导致内疚和自责。而内控型的个体通常依据自己的判断做出决定,提前制订计划,做好充分的准备,全力以赴做事,因此很少感受时间压力。在回归分析中,父母文化程度、母亲影响力和内外心理控制源对学生学习拖延行为的预测性最大,父母的文化程度会在一定程度上决定他们对待子女的教养方式,父母的文化程度越高,对孩子的管理越有计划,孩子的学习时间管理越合理,在一定程度上可以避免学习拖延。在一个家庭中母亲影响力最大,母亲的影响力与学生拖延行为之间有着显著的负相关,母亲更多地关注孩子的学习,学生学习更有计划,能更好地做好时间管理。相反,如果父亲是权威,父亲的专断行为与拖延之间存在显著相关,当孩子长期处于一种高权威压制下,会在一定程度上压抑孩子自己的内在决定,造成孩子的拖延程度增强趋势。

3.4 建议 通过以上的研究,为了降低护理大学生的拖延状况,需采取一定措施。一方面通过制定相应的措施,加强大学生的时间管理,如时间价值感、时间监控感和时间效能感的形成,在一定程度上降低大学生的学习拖延^[13];另一方面通过团体辅导的方式,强化大学生的时间管理的重要性^[14]。制定可操作性的计划及能增强自我效能感的团体活动,改善大学生拖延的问题。

参考文献:

- [1] Senecal C, Julien E, Guay F. Role conflict and academic procrastination: a self-determination perspective[J]. *Eur J Soc Psychol*, 2003, 33(1): 135-145.
- [2] Steel P. The nature of procrastination: a meta-analytic and theoretical review of quintessential self-regulatory failure[J]. *Psychol Bull*, 2007, 133(1): 65-94.
- [3] Ferrari JR, Diaz-Morales JF. Procrastination: different time orientations reflect different motives[J]. *J Res Pers*, 2007, 41(3): 707-714.
- [4] 陈保华. 大学生学习拖延初探[D]. 上海: 华东师范大学, 2007.
- [5] Watson DC. Procrastination and the five-factor model: a facet level analysis[J]. *Pers Individ differ*, 2001(30): 149-158.
- [6] 庞维国. 大学生学习拖延研究综述[J]. *心理科学*, 2010, 33(1): 147-150.
- [7] 张传花, 司继伟, 张宝成. 学习拖延影响因素研究述评[J]. *山东理工大学学报: 社会科学版*, 2010, 26(1): 106-109.
- [8] 黄晗. 大学生目标取向、自我效能及价值与学业拖延的关系研究[D]. 长春: 东北师范大学, 2006.
- [9] 庞维国, 韩贵宁. 我国大学生学习拖延的现状与成因研究[J]. *清华大学教育研究*, 2009, 30(6): 59-65, 94.
- [10] 高丽娜, 李丽娜, 闫亚曼. 大学生时间管理倾向与心理控制源、一般自我效能感的相关研究[J]. *中国健康心理学杂志*, 2009, 17(7): 838-840.
- [11] 田芊, 邓士昌. 心理控制源在时间管理倾向影响唤起性、回避性两类拖延行为中的不同中介作用[J]. *心理科学*, 2011, 34(2): 348-353.
- [12] 包翠秋, 张志杰. 拖延现象的相关研究[J]. *中国临床康复*, 2006, 10(34): 129-132.
- [13] 李洋. 大学生学习拖延及干预研究[D]. 天津: 天津大学, 2010.
- [14] 代丽男. 团体辅导对改善中学生学业拖延的实证研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古师范大学, 2011.

(收稿日期: 2014-08-08 修回日期: 2014-10-10)

(上接第 75 页)

- Mol Cell Biol, 2007, 8(1): 23-36.
- [12] Heo I, Kim VN. Regulating the regulators: posttranslational modifications of RNA silencing factors[J]. *Cell*, 2009, 139(1): 28-31.
 - [13] Miller AD, Miller DG, Garcia JV, et al. Use of retroviral vectors for gene transfer and expression[J]. *Methods Enzymol*, 1993, 217: 581-599.
 - [14] Lewis P, Hensel M, Emerman M. Human immunodeficiency virus infection of cells arrested in the cell cycle[J]. *EMBO J*, 1992, 11(8): 3053-3058.
 - [15] Lewis PF, Emerman M. Passage through mitosis is re-

quired for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus[J]. *J Virol*, 1994, 68(1): 510-516.

- [16] 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.
- [17] Mctaggart S, Al-Rubeai M. Retroviral vectors for human gene delivery[J]. *Biotechnol Adv*, 2002, 20(1): 1-31.
- [18] Pluta K, Kacprzak MM. Use of HIV as a gene transfer vector[J]. *Acta Biochim Pol*, 2009, 56(4): 531-595.

(收稿日期: 2014-08-08 修回日期: 2014-10-19)