

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.13.006

## 重组腺相关病毒介导的 RNAi 靶向治疗作用研究\*

于水澜<sup>1</sup> 姜颖<sup>1</sup> 张淑香<sup>1</sup> 韩松洋<sup>1</sup> 葛圆圆<sup>1</sup> 宋高臣<sup>2Δ</sup>

(1 黑龙江中医药大学基础医学院 黑龙江 哈尔滨 150040; 2 牡丹江医学院 黑龙江 牡丹江 157011)

**摘要 目的:** 采用前期成功构建的靶向沉默 CDK2 基因的重组腺相关病毒 rAAV-shRNA-CDK2 转染人肝癌 HepG2 细胞, 研究其对肝癌细胞增殖的抑制作用。**方法:** 取人肝癌 HepG2 细胞于裸鼠前肢腋下接种, 构建裸鼠皮下移植瘤模型, 将成瘤裸鼠随机分为三组: 肿瘤组、NC 对照组、rAAV-shRNA-CDK2 给药组。各试验组均通过尾静脉注射给药, 每隔五天用游标卡尺测量肿瘤的长径(a)、短径(b), 计算肿瘤体积。根据每组裸鼠移植瘤体积的平均值, 绘制移植瘤生长曲线。于给药 24 h 后处死, 称取瘤重, 计算抑瘤率, 应用实时荧光定量 PCR 和 Western blot 方法检测各组肝癌组织中 CDK2 基因 mRNA 和蛋白的表达量, 观察 rAAV-shRNA-CDK2 对肝癌组织 CDK2 表达的影响;**结果:** rAAV-shRNA-CDK2 能够显著抑制肝癌 HepG2 细胞的增殖, 其抑瘤率为 72.18%; 并能够下调肝癌组织中 CDK2 基因 mRNA 与蛋白表达量;**结论:** rAAV-shRNA-CDK2 实现了体内靶向治疗肝癌的目的, 并确定静脉定量给药方式。

**关键词:** 肝癌; 腺相关病毒; rAAV-shRNA-CDK2; 靶向治疗

**中图分类号:** R-33; R735.7; R730.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2018)13-2431-06

## Study of Recombinant Adeno-associated Virus Mediated RNAi Targeting Therapy\*

YU Shui-lan<sup>1</sup>, JIANG Ying<sup>1</sup>, ZHANG Shu-xiang<sup>1</sup>, HAN Song-yang<sup>1</sup>, GE Yuan-yuan<sup>1</sup>, SONG Gao-chen<sup>2Δ</sup>

(1 Basic Medical, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin, Heilongjiang, 150040, China;

2 Mudanjiang Medical School, Mudanjiang, Heilongjiang, 157011, China)

**ABSTRACT Objective:** To study the inhibitory effect on human hepatoma cells, the recombinant adenovirus rAAV-shRNA-CDK2, a target silenced CDK2 gene, was successfully transfected into human hepatoma HepG2 cells. **Methods:** Human hepatoma HepG2 cells were inoculated into the armpit of the forelimb of nude mice to establish subcutaneous xenograft model. The experiment was divided into three groups: tumor group, NC group and rAAV-shRNA-CDK2 group. All groups are through the tail vein injection. The tumor long diameter (a), short diameter (b) and tumor volume were measured and calculated with a vernier caliper after every five days. According to the mean tumor volume of nude mice in each group, the tumor growth curves were plotted. After last administrations for 24 hours, mice were killed and the tumor inhibition rate was calculated; the effect of rAAV-shRNA-CDK2 on CDK2 expression levels of mRNA and protein were studied by Real-time PCR and Western blot. **Results:** rAAV-shRNA-CDK2 can effectively inhibit the proliferation of HepG2 hepatoma cells. Its inhibition rate was 72.18%. rAAV-shRNA-CDK2 make the mRNA and protein expression of CDK2 in liver cancer tissues reduced significantly. **Conclusion:** Recombinant adeno-associated virus rAAV-shRNA-CDK2 realized the purpose of targeted therapy of liver cancer in vivo, and determined the quantitative dosing intravenous approach.

**Key word:** Liver cancer; Adeno-associated virus; RAAV-shRNA-CDK2; Targeted therapy

**Chinese Library Classification(CLC):** R-33; R735.7; R730.5 **Document code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2018)13-2431-06

### 前言

腺相关病毒 (Adeno-associated virus, AAV) 是一类线性单链无被膜的 DNA 病毒。AAV 载体具有可持续性表达、宿主范围广、定点特异性整合和无明显致病性等诸多优点, 广泛用于科研和临床的基因治疗<sup>[1-3]</sup>。CDK2 基因是细胞周期蛋白依赖性激酶(CDKs)家族的成员之一, 在细胞周期 G1/S 期的转换过程

中起着限速作用。CDK2 活性增高, 可以促进细胞的增殖和分化, 是细胞周期的正调节因子, 因此可通过抑制 CDKs 来调整细胞周期, 抑制肿瘤细胞的生长<sup>[4-6]</sup>。本研究以此作为肝癌基因治疗切入点, 以腺相关病毒 8 (AAV8) 作为转导载体<sup>[7,8]</sup>, 以 CDK2 作为肝癌基因治疗靶点, 构建 rAAV-shRNA-CDK2, 观察其对肝癌细胞的抑制作用。

### 1 材料与方法

\* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81573863); 黑龙江省自然科学基金项目(H2016075); 中国博士后科学基金项目(2016M590298)

作者简介: 于水澜(1978-), 女, 博士研究生, 副研究员, 在黑龙江中医药大学中医学专业博士后流动站进行研究工作, 研究方向: 主要从事中药防治老年性痴呆和中药抗肿瘤分子机制研究, E-mail: szys2001@163.com, 电话: 18088707070

Δ 通讯作者: 宋高臣(1971-), 男, 博士, 教授, 主要从事中药抗肿瘤分子生物学研究, E-mail: songgaochen@163.com

(收稿日期: 2017-11-07 接受日期: 2018-01-26)

### 1.1 试验材料

重组腺相关病毒 rAAV-shRNA-CDK2, 由上海艾博思生物科技有限公司合成。

BALB/c-nu 裸鼠 18 只, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 动物质量合格证号为 SCXX(京)2011-0011。雌性, 5-6 月龄, 体重 14-16 g。试验裸鼠饲养在无特定病原(Specific pathogen free, SPF)层流柜中, 恒温(20~26℃), 最大日温差 ≤ 4℃, 相对湿度(40~70%), 空气洁净度 7 级, 噪声 ≤ 60 dB(A), 昼夜明暗交替时间为 12/12 h, 所用笼具、垫料、饮水均消毒灭菌处理。

主要试验仪器: GE 紫外分光光度计 (GE GeneQuant 1300), 实时荧光定量 PCR 仪 (BioRad CFX96), 生物安全柜 (Healforce Class II Type B2), 电泳槽 (北京六一仪器厂 DY-CP-31DN), 电热恒温水槽 (上海一恒科学仪器有限公司 DK-8D), 凝胶成像仪 (上海天能科技有限公司 Tanon-2500)。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 建立试验动物模型与分组给药** 裸鼠饲养 3 天后开始接种, 使用处于对数生长期的 HepG 2 细胞对试验裸鼠进行皮下接种, 每只鼠接种细胞悬液 0.2 mL。接种后 10 天将裸鼠随机分成三组: 肿瘤组、NC (非相关序列) 对照组、rAAV-shRNA-CDK2 组。给药方式为尾静脉注射一次性定量给药, 每只给药量为 0.2 mL。肿瘤组注射 PBS 缓冲液, NC 对照组注射 rAAV-NC (滴度为  $1 \times 10^{12}$  v·g/mL), rAAV-shRNA-CDK2 组注射 rAAV-shRNA-CDK2 (滴度为  $1 \times 10^{12}$  v·g/mL)。

**1.2.2 抑瘤率** 接种后每隔五天用游标卡尺测量肿瘤的长径(a)、短径(b), 按照公式  $V = a \times b^2 / 2$ , 计算肿瘤体积。根据每组裸鼠移植瘤体积的平均值, 绘制移植瘤生长曲线。于给药 15 天后处死裸鼠, 完整剥离肿瘤组织, 称取瘤重, 按公式计算抑瘤率: 抑瘤率 = (肿瘤组瘤重 - rAAV-shRNA-CDK2 组瘤重 / 肿瘤组瘤重) × 100%。

**1.2.3 实时荧光定量 PCR 检测肝癌细胞 CDK2 基因 mRNA 表达** 按照 Trizol 法抽提各试验组总 RNA, 测定其纯度和浓度。依据 Genbank 数据库搜索 CDK2 mRNA 和 GAPDH mRNA 全基因序列, 应用软件 Primer Premie5.0 设计引物, 引物序列为: F primer: CCACCGAGACCTTAAACC, R primer: GTG-TAAGTACGAACAGGG, 扩增长度为 111 bp, GAPDH 引物序列为: F primer: AACCTGCCAAATATGATGAC, R primer: GC-CCAGGATGCCCTTGA 扩增长度为 74 bp。Real-time PCR 反应条件为 95℃ 预变性 3 min, 95℃ 变性 15 s, 55℃ 退火 30 s,

72℃ 延伸 30 s, 进行 40 个循环。根据扩增结果绘制标准曲线。各检测样本的 Ct 值采用美国 Stratagen 公司的 MX-3000P 软件进行分析, 根据溶解曲线来判断 PCR 反应的特异性, 采用相对定量法对 CDK2 基因进行检测。

**1.2.4 Western blot 检测肝癌细胞 CDK2 基因蛋白表达** 于液氮中取出 50 g 肿瘤组织, 加入 400 μL 组织蛋白裂解液, 冰上快速制备组织匀浆, 测定各组的总蛋白浓度, 再加入 1× SDS 凝胶加样缓冲液, 使各组蛋白浓度一致。制备合适浓度的分离胶和浓缩胶进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 转印至硝酸纤维素膜, 室温下放在摇床上封闭 2~3 h, 加入特异性抗体 (β-actin 按 1:5000 稀释, CDK2 按 1:200 稀释), 置摇床杂交 1~2 h, 用 TBST 清洗 3 次, 加入用辣根过氧化物酶标记的二抗 (1:1000 稀释), 在室温下置摇床杂交 1 h, 用 TBST 再次清洗 3 次, 按照 ECL 发光试剂盒使用说明在暗室里进行曝光、显影。胶片经扫描后应用 Gel-Pro Analyzer 软件进行条带的灰度分析, 经过独立的 3 次重复试验, 以 CDK2 条带的灰度值与内参照 β-actin 条带灰度值的比值来表示 CDK2 蛋白的相对表达量。

**1.2.5 统计学分析** 应用 SPSS 13.0 统计分析软件进行统计学分析, 试验结果以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 单因素方差分析 (One-Way, ANOVA) 进行组间差异的比较, 显著性差异水平以 0.05 和 0.01 为标准。

## 2 结果

### 2.1 裸鼠皮下移植瘤生长情况

裸鼠皮下接种 10 天后肿瘤直径达 5~7 mm, 各实验组分别给药后, rAAV-shRNA-CDK2 组裸鼠移植瘤生长速度放缓, 瘤体积较小, 而肿瘤组和 NC 组肿瘤生长迅速, 瘤体积较大 (见图 1-图 3, 表 1)。将三组肿瘤剥离称重并计算抑瘤率, 结果显示, rAAV-shRNA-CDK2 组瘤重与肿瘤组及 NC 对照组比较, 质量最小, 提示 rAAV-shRNA-CDK2 能够有效抑制人肝癌 HepG2 细胞的增殖, 其抑瘤率为 72.18%, 有极显著性差异 ( $P < 0.01$ ); NC 组与肿瘤组比较差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。

### 2.2 rAAV-shRNA-CDK2 对肝癌细胞 CDK2 基因 mRNA 表达的影响

对提取的三组肿瘤组织总 RNA 的完整度采用琼脂糖凝胶电泳方法进行检测, 条带 28S 与 18S 的亮度比值约为 2:1, 说明总 RNA 质量较好, 无降解, 可以满足后续试验的需要 (图 4)。对于总 RNA 浓度和纯度采用紫外分光光度计法进行测定, 结果 OD260/OD280 的比值均在 1.8~2.0 之间, 表明 RNA 样品的



图 1 各组裸鼠移植瘤生长情况

Fig. 1 Each experimental group xenograft tumor formation in nude mice

表 1 rAAV-shRNA-CDK2 对裸鼠移植瘤体积及瘤重的影响

Table 1 The impact of rAAV-shRNA-CDK2 on xenograft tumor volume and weight

| Groups                | Number of animals<br>(n) | Mean tumour volume<br>(mm <sup>3</sup> ) | Mean tumor weight<br>(g) | Inhibition rate of Tumou<br>(%) |
|-----------------------|--------------------------|------------------------------------------|--------------------------|---------------------------------|
| Tumour group          | 6                        | 510.2± 120.5                             | 2.121± 0.324             | -                               |
| NC group              | 6                        | 505.6± 109.7                             | 2.078± 0.217             | -                               |
| rAAV-shRNA-CDK2 group | 6                        | 146.5± 31.5*                             | 0.578± 0.103*            | 72.18                           |

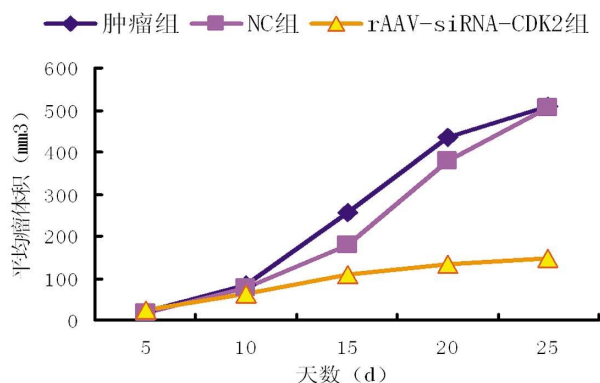
Note: \*compare to tumour group,  $P<0.01$ .

图 2 裸鼠皮下移植瘤生长曲线

Fig. 2 Nude subcutaneous transplantation tumor growth curve

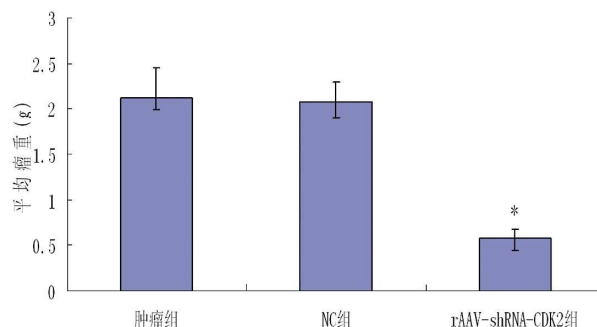
注: \* 与肿瘤组相比,  $P<0.01$ 。Note: \*compare to tumour group,  $P<0.01$ .

图 3 各试验组裸鼠瘤重情况

Fig. 3 Tumor weight in each experimental group

纯度非常好,并根据 OD260 值计算样品浓度。熔解曲线只有一个特征峰,说明 PCR 扩增特异性良好。将标准品依次进行 10 倍稀释,作为模板进行定量 PCR 反应,以标准品拷贝数的对数值为横坐标,以测得的 Ct 值为纵坐标,绘制标准曲线,其线性关系良好,GAPDH 和 CDK2 基因扩增效率基本一致,说明该试验所使用的引物和染料符合试验需求,可以准确地反映体系中所包含的模板数量(见图 5)。

从定量 PCR 的结果可知,相对于肿瘤组, rAAV-shRNA-CDK2 组 CDK2 基因的 mRNA 水平表达明显下降( $P<0.01$ ),其抑制率为 81.0%,提示 rAAV-shRNA-CDK2 可以有效抑制肝癌细胞 CDK2 基因 mRNA 水平的表达;NC 组与肿瘤组 CDK2 基因的 mRNA 表达水平无显著差异(见表 2,图 5、图 6)。

### 2.3 rAAV-shRNA-CDK2 对裸鼠肝癌细胞 CDK2 基因蛋白表达的影响

Western blot 检测结果显示, rAAV-shRNA-CDK2 组可见较弱的特异性条带,而肿瘤组和 NC 组条带则较亮(见图 7),相对于肿瘤组, rAAV-shRNA-CDK2 组 CDK2 基因蛋白表达明显下调( $P<0.01$ ),抑制率为 83.2%,NC 组与肿瘤组相比,CDK2 蛋白表达无显著性差异,提示 rAAV-shRNA-CDK2 可以有效抑制肿瘤细胞 CDK2 蛋白水平的表达(表 3,图 8)。

### 3 讨论

将外源基因导入生物细胞内进行基因治疗,需要一种即安全有效,又无毒副作用的载体<sup>[9-11]</sup>。本试验选择 AAV 作为基因转移的载体,AAV 因其可以长期稳定表达目的蛋白以及高度的生物安全性得到了越来越多的关注<sup>[12-15]</sup>。AAV 具有多种血清

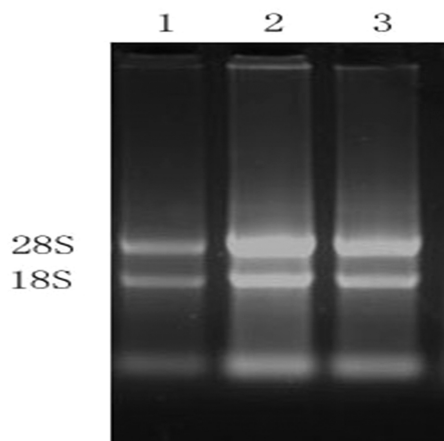


图 4 总 RNA 1% 甲醛琼脂糖凝胶电泳鉴定图

Fig. 4 Total RNA of 1% formaldehyde agarose gel electrophoresis

注: 1. 肿瘤组; 2. NC 组; 3. rAAV-shRNA-CDK2 组

Note: 1. Tumour group; 2. NC group; 3. rAAV-shRNA-CDK2 group

型,不同血清型转染的细胞类型和感染效率也各不相同,即对不同组织或细胞有特异亲嗜性。研究证实,AAV8 是迄今发现的转导肝脏组织效果最好的载体,对肝脏的转染效率较其它血清型高出 10~100 倍<sup>[16-19]</sup>。基于这些特性,本试验采用 AAV8 作为肝癌细胞的转导载体。大量研究表明肿瘤的发生与 CDK2 和其它细胞周期相关因子的异常表达有关,CDK2 基因表达异常,会引起细胞周期紊乱、细胞增殖失控,最终导致癌症<sup>[20,21]</sup>。因此,通过 CDK2 基因的深入研究,不仅有助于揭示肿瘤的发生机理,还能为肿瘤的治疗提供新的思路 and 手段,由此本试验将 CDK2 基因作为肝癌治疗靶点是一种可行的方法。关于 CDK2 基因的研究多见于体外试验,而体内研究较少,由于两者生存

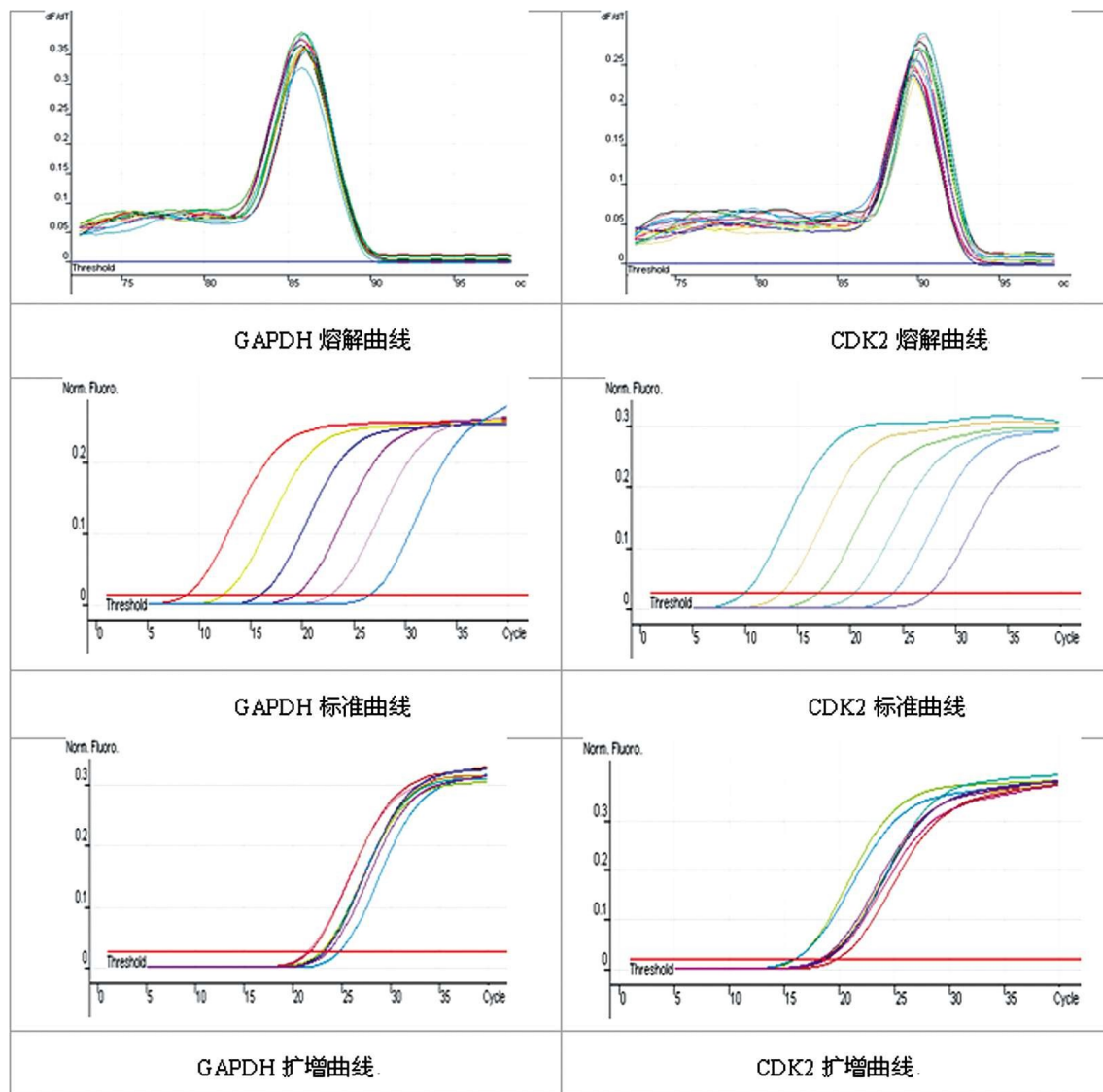


图 5 定量 PCR 扩增基因 GAPDH 和 CDK2 熔解曲线、标准曲线、扩增曲线  
Fig. 5 Quantitative PCR amplification of GAPDH Gene and CDK2 melting curve,  
standard curve, amplification curve

表 2 rAAV-shRNA-CDK2 对肝癌细胞 CDK2 基因 mRNA 水平的影响  
Table 2 The impact of rAAV-shRNA-CDK2 on hepatoma cells CDK2 gene mRNA levels

| Groups                | Gapdh C <sub>T</sub> | CDK2 C <sub>T</sub> | $\Delta C_T$ | $\Delta \Delta C_T$<br>(sample- tumor) | $2^{-\Delta \Delta C_T}$<br>(Sample/tumor) | Ratio of<br>inhibition(%) |
|-----------------------|----------------------|---------------------|--------------|----------------------------------------|--------------------------------------------|---------------------------|
| Tumour group          | 15.45± 0.31          | 18.69± 0.36         | 3.24± 0.26   | 0± 0.02                                | 1 (0.79-1.21)                              | -                         |
| NC group              | 15.95± 0.32          | 19.25± 0.27         | 3.30± 0.28   | 0.05± 0.01                             | 0.96 (0.82-1.11)                           | -                         |
| rAAV-shRNA-CDK2 group | 16.10± 0.36          | 21.75± 0.46         | 5.65± 0.33   | 2.40± 0.22                             | 0.19 (0.14-0.24) *                         | 81.0                      |

Note: \*compare to tumour group,  $P < 0.01$ .

环境存在较大的差异,体外培养的组织或细胞,其形态和功能均会发生一定程度的改变,不能够全面真实的反应临床治疗的有效性。因此,利用肿瘤细胞株建立移植瘤模型进行体内试验是研究基因治疗最有效的手段<sup>[22-25]</sup>。本文选用 CDK2 作为肝癌基因治疗靶点,利用 AAV8 对肝细胞的高度亲嗜性,成功构建了以 CDK2 为目的基因、以 EGFP 为报告基因的重组腺相关病毒 rAAV-shRNA-CDK2 转染肝癌细胞<sup>[26-30]</sup>。结果表明,重组腺

相关病毒 rAAV-shRNA-CDK2 能够持续稳定抑制 CDK2 的表达,从而有效抑制肝癌细胞的增殖,其抑瘤率达到 72.18%,提示 CDK2 基因可以作为肝癌基因治疗的有效靶点之一,重组腺相关病毒 rAAV-shRNA-CDK2 实现了体内靶向治疗肝癌的目的,并确定静脉一次性定量给药方式,为肝癌基因治疗提供了新的手段和实验基础。

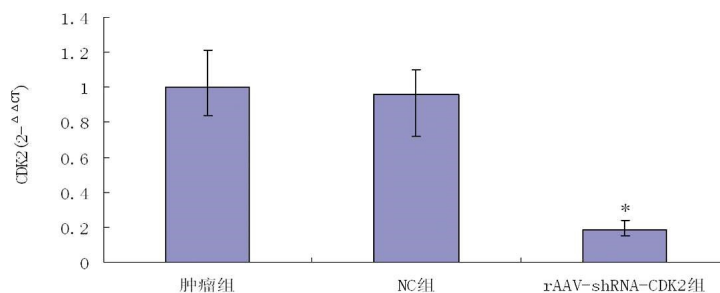


图 6 rAAV-shRNA-CDK2 对肝癌细胞 CDK2 基因 mRNA 水平的相对定量分析

Fig. 6 Relative quantitative analysis of rAAV-shRNA-CDK2 inhibited the mRNA level of CDK2 in hepatoma cells

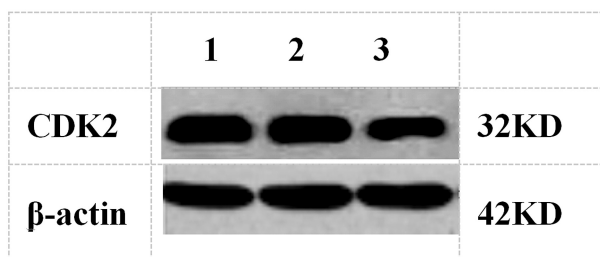
注: \* 与肿瘤组相比,  $P < 0.01$ 。Note: \*compare to tumour group,  $P < 0.01$ .

图 7 Western blot 检测肝癌细胞 CDK2 基因蛋白表达情况

Fig.7 Western blot detection of hepatoma cells CDK2 gene protein expression

注: 1. NC 组; 2. 肿瘤组; 3. rAAV-shRNA-CDK2 组

Note: 1. NC group; 2 Tumor group;

3 rAAV-shRNA-CDK2 group

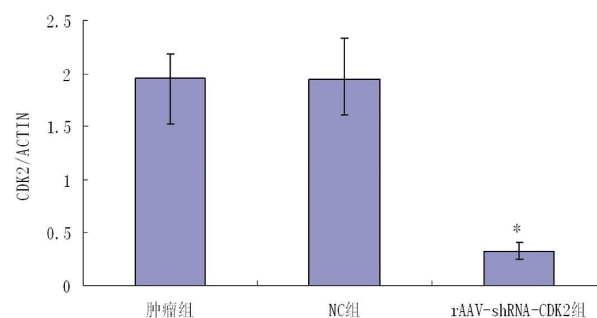


图 8 rAAV-shRNA-CDK2 对肝癌细胞 CDK2 基因蛋白表达的相对定量分析

Fig.8 Relative quantitative analysis of rAAV-shRNA-CDK2 inhibition of hepatoma cells CDK2 protein expression

注: \* 与肿瘤组相比,  $P < 0.01$ 。Note: \*compare to tumour group,  $P < 0.01$ .

表 3 rAAV-shRNA-CDK2 对肝癌细胞 CDK2 基因蛋白表达的影响

Table 3 rAAV-shRNA-CDK2 inhibition of hepatoma cells CDK2 protein expression

| Groups                | CDK2/ACTIN    | Sample/ tumor | Ratio of inhibition(%) |
|-----------------------|---------------|---------------|------------------------|
| Tumour group          | 1.953± 0.235  | 1             | -                      |
| NC group              | 1.944± 0.391  | 0.995         | -                      |
| rAAV-shRNA-CDK2 group | 0.328± 0.285* | 0.168         | 83.2                   |

Note: \*compare to tumour group,  $P < 0.01$ .

## 参考文献(References)

- [1] Ku CA, Chiodo VA, Boye SL, et al. Gene therapy using self-complementary Y733F capsid mutant AAV2/8 restores vision in a model of early onset Leber congenital amaurosis [J]. Hum Mol Gene, 2011, 20(23): 4569-4581
- [2] Li H, Malani N, Hamilton SR, et al. Assessing the potential for AAV vector genotoxicity in a murine model [J]. Blood, 2011, 117 (12): 3311-3319
- [3] Aartsen WM, van Cleef KW, Pellissier LP, et al. GFAP-driven GFP expression in activated mouse Muller glial cells aligning retinal blood vessels following intravitreal injection of AAV2/6 vectors [J]. PLoS ONE, 2010, 5(8): e12387
- [4] Zhi-Jie, Hou Xi, Luo Wei, et al. Flubendazole, FDA-approved anthelmintic, targets breast cancer stem-like cells [J]. Oncotarget, 2015, 6(8): 6326-6340
- [5] Chohan TA, Qian H, Pan Y, et al. Cyclin-dependent kinase-2 as a target for cancer therapy: progress in the development of CDK2 inhibitors as anti-cancer agents [J]. Curr Med Chem, 2015, 22 (2): 237-263
- [6] Asghar U, Witkiewicz AK, Turner NC, et al. The history and future of targeting Cyclin-dependent kinases in cancer therapy[J]. Nat Rev Drug Discov, 2015, 14(2): 130-146
- [7] Snyder RO, Philippe M. Adeno-Associated Virus: Methods and Protocols[M]. Hatfield: Humana Press, 2011: 74-101
- [8] Srivastava A. In vivo tissue-tropism of adeno-associated viral vectors [J]. Curr Opin Virol, 2016, 21: 75-80
- [9] Sangh S, Gupta SK, Nischal A, et al. HDVDB; a data warehouse for hepatitis delta virus[J]. International journal of bioinformatics research and applications, 2015, 11(2): 162-170
- [10] Kirsty Jensen, Jennifer A, Anderson, et al. Comparison of small interfering RNA (siRNA) delivery into bovine monocyte-derived macrophages by transfection and electroporation [J]. Veterinary

- immunology and immunopathology, 2014, 158(3-4): 221-232
- [11] Hui Zhang, Jian Gong, Di Kong, et al. Anti-proliferation effects of Twist gene silencing in gastric cancer SGC7901 cells [J]. World journal of gastro enterology: WJG, 2015, 21(10): 2926-2936
- [12] Meng X, Feng Y, Ouyang T, et al. Specific gene expression in mouse cortical astrocytes is mediated by a 1740bp-GFAP promoter-driven combined adeno-associated virus 2 /5 /7 /8 /9 [J]. Neurosci Lett, 2015, 593: 45-50
- [13] Kotterman MA, Schaffer DV. Engineering adeno-associated viruses for clinical gene therapy[J]. Nat Rev Genet, 2014, 15(7): 445-446
- [14] Dalkara D, Sahel JA. Gene therapy for inherited retinal degenerations [J]. CR Biol, 2014, 337(3): 185-186
- [15] Ohmori T, Mizukami H, Ozawa K, et al. New approaches to gene and cell therapy for hemophilia [J]. J Thromb Haemost, 2015, 13 Suppl1: S133
- [16] Chandler RJ, LaFave MC, Varshney GK, et al. Genotoxicity in Mice Following AAV Gene Delivery: A Safety Concern for Human Gene Therapy[J]. Mol Ther, 2016, 24(2): 198
- [17] Calcedo R, Morizono H, Wang L, et al. Adeno-associated virus antibody profiles in newborns, children and adolescents [J]. Clin Vaccine Immunol, 2011, 18(9): 1586
- [18] Mingozzi F, Chen Y, Edmonson SC, et al. Prevalence and pharmacological modulation of humoral immunity to AAV vectors in gene transfer to synovial tissue[J]. Gene Ther, 2013, 20(4): 417
- [19] Boutin S, Monteilhet V, Veron P, et al. Prevalence of serum IgG and neutralizing factors against adeno-associated virus (AAV) types 1, 2, 5, 6, 8, and 9 in the healthy population: implications for gene therapy using AAV vectors[J]. Hum Gene Ther, 2010, 21(6): 704
- [20] Zhi-Jie Hou, Xi Luo, Wei Zhang, et al. Flubendazole, FDA-approved anthelmintic, targets breast cancer stem-like cells [J]. Oncotarget, 2015, 6(8): 6326-6340
- [21] Mratin Lange, Tatsuya Fujikawa, Anna Koulova, et al. Arterial territory-specific phosphorylated retinoblastoma protein species and CDK2 promote differences in the vascular smooth muscle cell response to mitogens[J]. Cell cycle(Georgetown, Tex.), 2014, 13(2): 315-323
- [22] Zhang H, Gao X, Yang Y, et al. New construction of an animal model for the orthotopic transplantation of an ovarian tumor [J]. Ovarian Res, 2014, 7(3): 64-65
- [23] Day CP, Merlino G, Van Dyke T. Preclinical mouse cancer models; a maze of opportunities and challenges[J]. Cell, 2015, 163(1): 39-53
- [24] Lee YY, Cho YJ, Chai JJ, et al. The effect of high-intensity focused ultrasound in combination with cisplatin using a Xenograft model of cervical cancer[J]. Anticancer Res, 2012, 32(12): 5285-5289
- [25] Decaudin D. Primary human tumor xenografted models ('tumorgrafts') for good management of patients with cancer [J]. Anticancer Drugs, 2011, 22(9): 827-841
- [26] 曾扬,吴小红,胡靓雅.重组8型腺相关病毒介导HBV急性感染树鼯模型建立[J].中国实验动物学报, 2013, 21(3): 36-41  
Zeng Yang, Wu Xiao-hong, Hu Liang-ya. Recombinant adeno-associated virus type 8 mediated acute HBV infection model of tree shrew [J]. Chinese Journal of Laboratory Animal Science, 2013, 21(3): 36-41
- [27] 董小岩,尉迟捷,王刚.高嗜肝性8型重组腺相关病毒体内转导法制备乙型肝炎病毒持续感染小鼠模型[J].病毒学报, 2010, 26(6): 425-431  
Dong Xiao-yan, Wei Chi-jie, Wang Gang. High hepatophilic type 8 recombinant adeno-associated virus in vivo transduction of preparation of hepatitis B virus persistent infection model in mice[J]. Journal of virus, 2010, 26(6): 425-431
- [28] 王国靖,王刚,董小岩.用重组型腺相关病毒载体介导的乙型肝炎病毒持续感染小鼠模型评价核苷类似物的抗病毒效果[J].生物工程学报, 2013, 29(1): 95-106  
Wang Guo-jing, Wang Gang, Dong Xiao-yan. A mouse model of evaluation of nucleoside analogues of persistent infection of hepatitis B virus using recombinant adeno-associated virus vector mediated antiviral effect type [J]. Journal of bioengineering, 2013, 29(1): 95-106
- [29] Nakai H, Fuess S, Storm TA, et al. Unrestricted hepatocyte transduction with adeno-associated virus serotype 8 vectors in mice [J]. J Virol, 2005, 79(1): 214-224
- [30] Sarkar R, Tetreault R, Gao G, et al. Total correction of hemophilia A mice with canine FVIII using an AAV8 serotype [J]. Blood, 2004, 103(4): 1253-1260

(上接第 2456 页)

- [21] Chengqun Huang, Smadar Yitzhaki, Cynthia N. Perry, et al. Autophagy Induced by Ischemic Preconditioning is Essential for Cardio-protection[J]. J of Cardiovasc Trans Res, 2010, 3: 365-373
- [22] M Zhao, L Sun, X J Yu, et al. Acetylcholine mediates AMPK-dependent autophagic cytoprotection in H9c2 cells during hypoxia/reoxygenation injury[J]. Cell Physiol Biochem, 2013, 32: 601-613
- [23] K Yang, C Xu, X Li, et al. Combination of D942 with curcumin protects cardiomyocytes from ischemic damage through promoting autophagy[J]. J. Cardiovasc Pharmacol Ther, 2013, 18: 570-581
- [24] Toshinori Aoyagi, Yoichiro Kusakari, Chun-Yang Xiao, et al. Cardiac mTOR protects the heart against ischemia-reperfusion injury[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2012, 303: H75-H85
- [25] X Wu, L He, Y Cai, et al. Induction of autophagy contributes to the myocardial protection of valsartan against ischemia-reperfusion injury [J]. Mol Med Rep, 2013, 8: 1824-1830