

小鼠 CD80 和 CD86 基因 RNA 干扰慢病毒载体的构建及体外对树突状细胞的作用

顾晓冬 洪 军 项建斌[△] 陈宗祐

(复旦大学附属华山医院普外科 上海 200040)

【摘要】 目的 构建小鼠 CD80 和 CD86 基因 RNA 干扰慢病毒表达载体,并在体外观察其对小鼠骨髓源性树突状细胞(dendritic cell,DC)的作用。方法 针对已经筛选确定的 CD80 基因 RNA 干扰有效靶序列,合成靶序列的双链 DNA,接入 pGCL-GFP 载体,再与 pHelper1.0 和 pHelper2.0 质粒共转染 293T 细胞,包装产生慢病毒,以 293T 细胞 GFP 蛋白的表达水平测定病毒滴度;同法构建出 CD86 基因 RNA 干扰慢病毒载体。慢病毒感染体外培养的 DC,通过荧光显微镜检测感染效率,Annexin V/PI 双染色法检测感染细胞凋亡和坏死情况,流式细胞仪检测 CD80 和 CD86 的表达情况。结果 PCR 和测序证实,pGCL-CD80 shRNA 和 pGCL-CD86 shRNA 慢病毒载体构建正确,病毒滴度均达 2×10^7 TU/mL,适合感染 DC 的 MOI 值为 20,此时慢病毒对 DC 具有低毒性,感染效率为 85.42%。CD80 和 CD86 表达的抑制率分别为 82.05% 和 77.78%。结论 成功构建出小鼠 CD80 和 CD86 基因 RNA 干扰慢病毒载体,其有明显抑制 DC 表面 CD80 和 CD86 的表达,这为移植物排斥提供了新的治疗手段。

【关键词】 慢病毒; CD80; CD86; RNA 干扰; 树突状细胞

【中图分类号】 R 392.4 **【文献标识码】** A

Construction of lentiviral vectors targeting mouse CD80 and CD86 genes by RNA interference and their effects on dendritic cells *in vitro*

GU Xiao-dong, HONG Jun, XIANG Jian-bin[△], CHEN Zong-you

(Department of General Surgery, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China)

【Abstract】 Objective To construct lentiviral vectors targeting mouse CD80 and CD86 genes by RNA interference and to study their effects on bone marrow-derived dendritic cells(DC) *in vitro*. **Methods** The effective sequence of siRNA targeting CD80 gene was confirmed in our previous experiment. The complementary DNA containing both sense and antisense oligonucleotides of the targeting sequence was designed, synthesized. After being annealed, the double-stranded DNA was inserted into the pGCL-GFP vector. The resulting lentiviral vector was named pGCL-CD80 shRNA. 293T cells were cotransfected with pGCL-CD80 shRNA, pHelper1.0 and pHelper2.0. The titer of virus was tested according to the expression level of GFP. Lentiviral vector targeting mouse CD86 gene by RNA interference was constructed in the same way. The recombinant lentiviruses were used to infect DC separated from femurs and tibias of mice *in vitro*. The infection efficiency was assessed by fluorescence microscope. The cell viability of infected DC was determined by annexin V and propidium iodine staining. The expression of CD80 and CD86 was analyzed by flow cytometry. **Results** PCR and DNA sequencing demonstrated that pGCL-CD80 shRNA and pGCL-CD86 shRNA were constructed

国家自然科学基金(30400428),国家自然科学基金(30772035),复旦大学上海医学院基础-临床医学交叉研究基金,上海高校优秀青年教师后备人选培养计划和复旦大学“世纪之星科研培养计划”项目

[△]Corresponding author E-mail: xjbzhw@163.com

successfully. The titer of the recombinant lentiviruses was both 2×10^7 TU/mL and the best MOI for lentivirus infecting DC was 20. Lentiviruses demonstrated a high (85.42%) infection efficiency of DC without affecting cellular viability. The inhibitory rates of CD80 and CD86 expression were 82.05% and 77.78% respectively. **Conclusions** Lentiviral vectors targeting mouse CD80 and CD86 genes by RNA interference were constructed successfully. The recombinant lentiviruses show significant inhibitory effects on CD80 and CD86 expression in DC. This approach is a potential therapeutic option for allograft rejection.

【Key words】 lentivirus; CD80; CD86; RNA interference; dendritic cell

CD80 和 CD86 是树突状细胞(dendritic cell, DC)表面最重要的共刺激分子,通过与 T 细胞表面 CD28 分子结合可协同激活初始型 T 淋巴细胞成为效应细胞或记忆细胞,促进 T 细胞增殖分化,发挥重要的共刺激作用。文献报道抑制 DC 表面 CD80 和 CD86 的表达,阻断共刺激通路,可诱导供体特异性的免疫耐受^[1]。

近年来的研究表明,一些双链 RNA 可以通过促使特定基因的 mRNA 降解从而高效、特异地阻断体内特定基因表达,诱使细胞表现出特定基因缺失的表型,即 RNA 干扰^[2]。我们在前期实验中^[3],成功筛选出两条抑制效率较高的小分子干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA): CD80 siRNA 和 CD86 siRNA。我们发现 siRNA 能够下调 DC 靶基因 mRNA 的表达水平,同时发现通过脂质体转染试剂导入化学合成 siRNA,转染效率不高且作用时间短暂,限制了其在临床免疫治疗中的应用。

慢病毒载体既可以感染分裂细胞又可以感染不分裂细胞,还可整合到宿主细胞的染色体基因组上,转录出发夹结构 RNA (short hairpin RNA, shRNA),其在细胞内经过加工后变成 siRNA,长时间、稳定地引发基因沉默或表达抑制,并且该病毒还具有低免疫原性^[4]。为了适应抗排斥反应的长期需要,本研究构建了 CD80 和 CD86 基因的 RNA 干扰慢病毒载体,以期获得长期 CD80 和 CD86 沉默效应。

材料和方法

实验动物和试剂 7~9 周龄健康 C3H 小鼠(H-2^k),重约 25 g,雌雄不限,购自中国科学院上海实验动物中心。红细胞裂解液、胎牛血清、胰蛋白酶、FACS 洗涤液和 FACS 固定液由上海交通大学医学院上海市免疫学研究所提供。RPMI 1640 培养基和 Opti-MEN 培养基购自 GIBCO 公司。RPMI 1640 完全培养基即 RPMI 1640 培养基中加入体积分数为 10% 的胎牛血清。293T 细胞株由中国科学院细

胞库提供。大肠埃希菌菌株 DH5 α 、DMEM 培养基、Lipofect AMINE 2000 试剂、Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司。重组小鼠粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(rmGM-CSF)、FITC 标记抗小鼠 CD80 和 CD86 的抗体均购自 R&D 公司。FITC 标记抗小鼠 MHC-II 和 CD11c 的抗体均购自 eBioscience 公司。脂多糖购自 Sigma 公司。Annexin V/PI 双染色法检测试剂盒购自 BioSource 公司。PCR 试剂盒购自 Promega 公司。慢病毒载体系统由上海吉凯基因化学技术有限公司提供,该病毒系统由 pGCL-GFP、pGCL-RFP、pHelper1.0、pHelper2.0 质粒组成,其中 pGCL-GFP 含有能持续表达小 RNA 的元件,同时能表达绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP);pGCL-RFP 也含有能持续表达小 RNA 的元件,同时能表达红色荧光蛋白(red fluorescent protein, RFP)。pHelper1.0 和 pHelper2.0 含有病毒包装所必须的元件。限制性内切酶、T4 噬菌体 DNA 连接酶购自 New England Biolabs 公司。大量质粒 DNA 提取试剂盒购自 Qiagen 公司。

双链 DNA 的设计与合成 在 GenBank 中查到小鼠 CD80 mRNA 序列(登录号 NM_009855)和小鼠 CD86 mRNA 序列(登录号 NM_019388),根据以下原则^[5]挑选合适的靶碱基对:(1) 最适宜长度为 21~23 个碱基对;(2) GC 含量在 30%~50% 左右;(3) 不位于 5 端和 3 端的非编码区;(4) 所选序列与其他基因不同源。针对 CD80 和 CD86 的 siRNA 由上海吉凯基因化学技术有限公司合成,同时该公司还合成了阴性对照 siRNA,这些序列不与任何已知基因有同源性。根据前期实验^[3]发现能有效产生基因沉默效应的 CD80-1 siRNA 和 CD86-3 siRNA 的靶序列设计 Oligo DNA,在互补的靶序列中间加入 Loop,序列为 TTCAAGAGA。作为转录终止信号的 6 个 T 和 6 个 A 分别位于正向 Oligo DNA 的 3 端和反向 Oligo DNA 的 5 端(序列见表 1)。以上 Oligo DNA 由上海吉凯基因化学技术有限公司合成。每对 Oligo DNA 退火后形成双链 DNA。

表 1 插入慢病毒载体 Oligo DNA 的序列

Tab 1 Sequences of DNA oligonucleotides for inserting lentivirus vector

Name	5'	Sense	Loop	Antisense	3'
CD80 forward	T	AAGGAAAGAGGAACGTATGAA	TTCAAGAGA	TTCATACGTTCTCTTTTCCTT	TTTTTTC
CD80 reverse	TCGAGAAAAAA	AAGGAAAGAGGAACGTATGAA	TCTCTTGAA	TTCATACGTTCTCTTTTCCTT	A
CD86 forward	T	GCACAGAGAACTTGATAGTGT	TTCAAGAGA	ACACTATCAAGTTTCTCTGTGC	TTTTTTC
CD86 reverse	TCGAGAAAAAA	GCACAGAGAACTTGATAGTGT	TCTCTTGAA	ACACTATCAAGTTTCTCTGTGC	A
Control forward	T	TTCTCCGAACGTGTACGT	TTCAAGAGA	ACGTGACACGTTCCGGAGAA	TTTTTTC
Control reverse	TCGAGAAAAAA	TTCTCCGAACGTGTACGT	TCTCTTGAA	ACGTGACACGTTCCGGAGAA	A

pGCL-CD80 shRNA 和 pGCL-CD86 shRNA 载体的构建 Hpa I 和 Xho I 双酶切 pGCL-GFP/RFP 载体以使其线性化,将退火的双链 DNA 与回收的线性载体用 T4 噬菌体 DNA 连接酶进行连接。连接产物转化大肠埃希菌菌株 DH5 α 感受态细胞。挑取重组阳性克隆行 PCR。PCR 鉴定阳性克隆的引物 Up: 5'GTGTCACTAGGCGGGAACAC3'; Down: 5'TTATTCCCATGCGACGGTATC 3'。PCR 反应条件:94 °C 预变性 30 s,94 °C 变性 30 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,30 个循环,72 °C 延伸 6 min。挑取阳性克隆菌液送 Invitrogen 公司测序。

慢病毒的包装 转染前用胰蛋白酶消化对数生长期的 293T 细胞,调整细胞密度为 $1.2 \times 10^7/20$ mL,重新接种于 15 cm 培养皿,置 37 °C,5% CO₂ 培养箱培养,待细胞密度达 70%~80% 时进行转染。以构建 CD80 基因 RNA 干扰慢病毒为例,将 3 种质粒 pGCL-CD80 shRNA 20 μ g、pHelper 1.0 15 μ g 和 pHelper2.0 10 μ g 在 100 μ L LipofectAMINE 2000 作用下,转染 293T 细胞。转染后 48 h 收集 293T 细胞上清液,经 4 °C,4 000 r/min 离心 10 min 和 0.45 μ m 滤器过滤去除细胞碎片,获得未浓缩培养上清液。病毒粗提液再经离心浓缩后,分装在病毒管于 -80 °C 低温冻存待用。使用 pGCL-RFP 构建出 CD86 基因 RNA 干扰慢病毒。另根据阴性对照 siRNA,使用 pGCL-GFP 构建出阴性对照慢病毒。

病毒滴度的测定 293T 细胞接种于 96 孔板中,每孔 5×10^4 个细胞,体积为 100 μ L。24 h 后,取 8 个 Ep 管,每管加入 90 μ L 的 DMEM 培养基,加 10 μ L 病毒颗粒于第 1 管,混合,从第 1 管取 10 μ L 混合液加入下一管,混合;依次稀释病毒颗粒至第 8 管;将 96 孔板每孔吸去 90 μ L DMEM 培养基,加入病毒颗粒稀释液,置 37 °C,5% CO₂ 培养箱培养 24 h,每孔更换 100 μ L DMEM 培养基。4 d 后倒置荧光显微镜下检测 GFP/RFP 表达量,计算病毒滴度。公式为: $T = (I \times M) / V$ 。I 为荧光细胞比例, M 为病毒加入时细胞总数, V 为所加病毒液中含有的病毒原液体积数。

慢病毒感染 DC 根据文献报道^[6] 并加以改进,将小鼠处死后,无菌切取小鼠胫骨和股骨,剪断骨头

两端,用含有 RPMI 1640 培养基的 1 mL 注射器反复冲洗骨髓腔,制成单细胞悬液,加红细胞裂解液溶解红细胞,离心去除溶解的红细胞膜,重悬细胞, RPMI 1640 完全培养基调整细胞浓度至 4×10^5 / mL;将上述所得的骨髓单细胞悬液按 0.5 mL/孔接种至 24 孔板,每孔在加入含 rmGM-CSF 的 RPMI 1640 完全培养基 0.5 mL,使 rmGM-CSF 终浓度为 10 ng/mL,置 37 °C,5% CO₂ 培养箱培养,细胞培养至融合率约为 30%~50% 时进行病毒感染。-80 °C 保存的病毒在冰上融化。以 MOI 为 1、5、10、20、40、80 感染 DC。隔天换液培养至第 6 天,加入脂多糖,其终浓度为 1 μ g/mL。继续在 37 °C,5% CO₂ 培养箱培养 48 h,然后以流式细胞术根据 DC 表面标志 CD11c 进行鉴定,收集纯度达 80% 以上的培养板中 DC 备用。

流式细胞仪检测细胞活性和细胞表面分子的表达 脂多糖刺激后 48 h,冲洗后收集重悬细胞,以 RPMI 1640 完全培养基调整细胞浓度至 1×10^6 / mL,取 100 μ L 置 FACS 管,加入 FITC 标记抗小鼠 CD80、CD86、MHC-II 及 CD11c 的抗体,室温下避光温育 20 min,FACS 洗涤液洗涤,FACS 固定液固定,Becton Dickinson 公司流式细胞仪检测,数据分析采用 CELLQUEST 数据分析软件进行。FITC 标记大鼠 IgG2a 为阴性对照。使用 Annexin V/PI 双染色法检测试剂盒测定转染细胞凋亡和坏死情况。每组 3 个复孔,每组实验均重复 3 次。

统计学分析 实验所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 Stata 8.0 统计软件进行数据处理,采用单因素方差分析两两比较的 Scheff 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

CD80 shRNA 和 CD86 shRNA 载体的构建和鉴定 CD80 和 CD86 基因 shRNA 的 Oligo DNA,经退火形成双链 DNA,分别与经 Hpa I 和 Xho I 双酶切后的 pGCL-GFP 和 pGCL-RFP 载体连接,连接产物转化大肠埃希菌菌株 DH5 α ,挑取重组阳性克隆,行 PCR 鉴定阳性克隆,鉴定结果与预期相符

(图1)。测序结果表明合成的 CD80 shRNA 和 CD86 shRNA 的 Oligo DNA 序列插入正确,此时命

名慢病毒重组载体为 pGCL-CD80 shRNA 和 pGCL-CD86 shRNA(图2)。

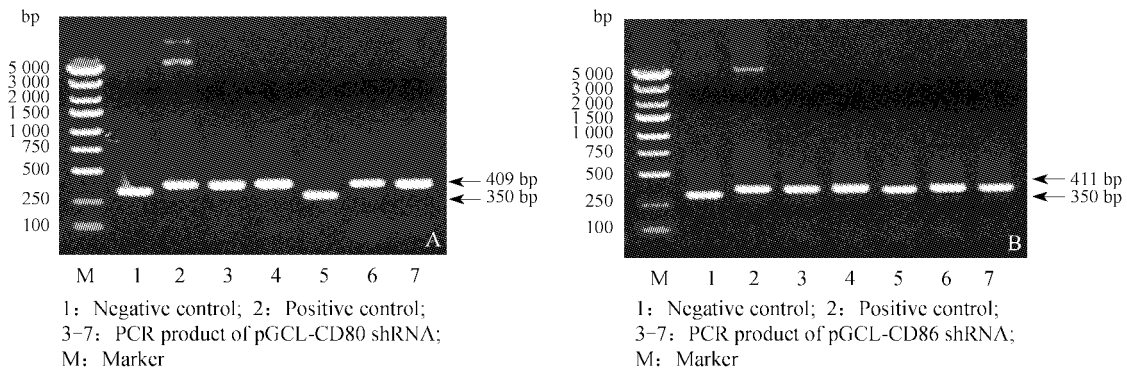


图1 PCR 鉴定重组载体

Fig 1 PCR identification of shRNA expression vectors

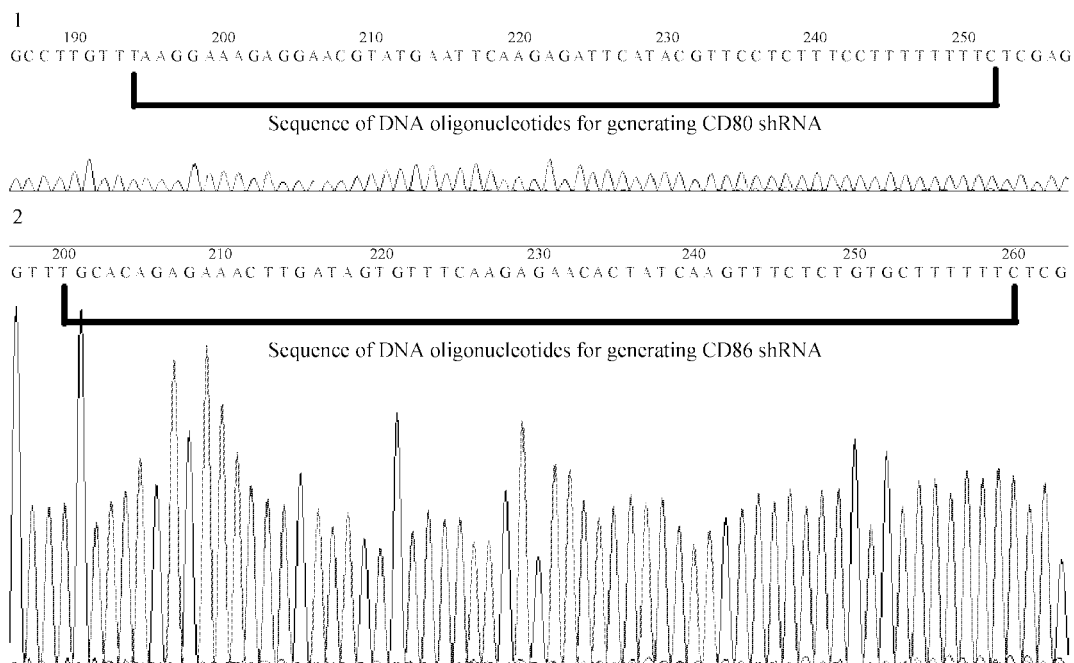


图2 重组载体的测序结果(部分)

Fig 2 DNA sequencing of shRNA expression vectors(part)

1:DNA sequencing of pGCL-CD80 shRNA; 2:DNA sequencing of pGCL-CD86 shRNA

重组 pGCL-CD80 shRNA 和 pGCL-CD86 shRNA 慢病毒载体的包装 将 3 种质粒 pGCL-CD80 shRNA、pHelper1.0 和 pHelper2.0 共转染 293T 细胞,在荧光显微镜下观察各孔中 GFP 的表达量,荧光细胞比例为 2.38% 时,加入的病毒液中含有的病毒原液为 $0.1 \mu\text{L}$,病毒加入时细胞总数 1×10^5 。病毒滴度 $T = (I \times M) / V = (2.38\% \times 1 \times 10^5) / (0.1 \times 10^{-3} \text{ mL}) \approx 2 \times 10^7 \text{ TU/mL}$,同法测得 CD86 基因 RNA 干扰慢病毒滴度 $T = (I \times M) / V = (2.47\% \times 1 \times 10^5) / (0.1 \times 10^{-3} \text{ mL}) \approx 2 \times 10^7 \text{ TU/mL}$,说明有大量质粒转入 293T 细胞,病毒成功包装。

骨髓源性成熟 DC 的体外培养 培养 24 h 后,培养板上有许多集落出现,以粒细胞集落居多;48 h 后吸弃悬浮的集落细胞,剩下部分半贴壁半悬浮的 DC 集落存在;到第 4 天,此类集落数量剧增,集落表面的细胞可见有长短不一的突起;加入脂多糖后,大量细胞从集落中释放出来,释放的细胞突起较长。流式细胞仪检测,DC 表面 CD80、CD86 阳性率达 80%,MHC-II、CD11c 阳性率达 90%。

重组慢病毒感染 DC 阴性对照慢病毒以 MOI 为 1、5、10、20、40、80 感染 DC,96 h 后利用荧光显微镜检测感染效率和 Annexin V/PI 双染色法测定感染细胞坏死率。当 $\text{MOI} < 20$ 时,感染效率低,MOI = 5

时,慢病毒感染效率为 7.68%(图 3);当 MOI>20 时, DC 坏死率增高,MOI = 80 时,DC 坏死率为 68.14%

(图 4)。MOI = 20 时,慢病毒感染效率为 85.42%(图 3),此时 DC 坏死率为 3.42%(图 4)。

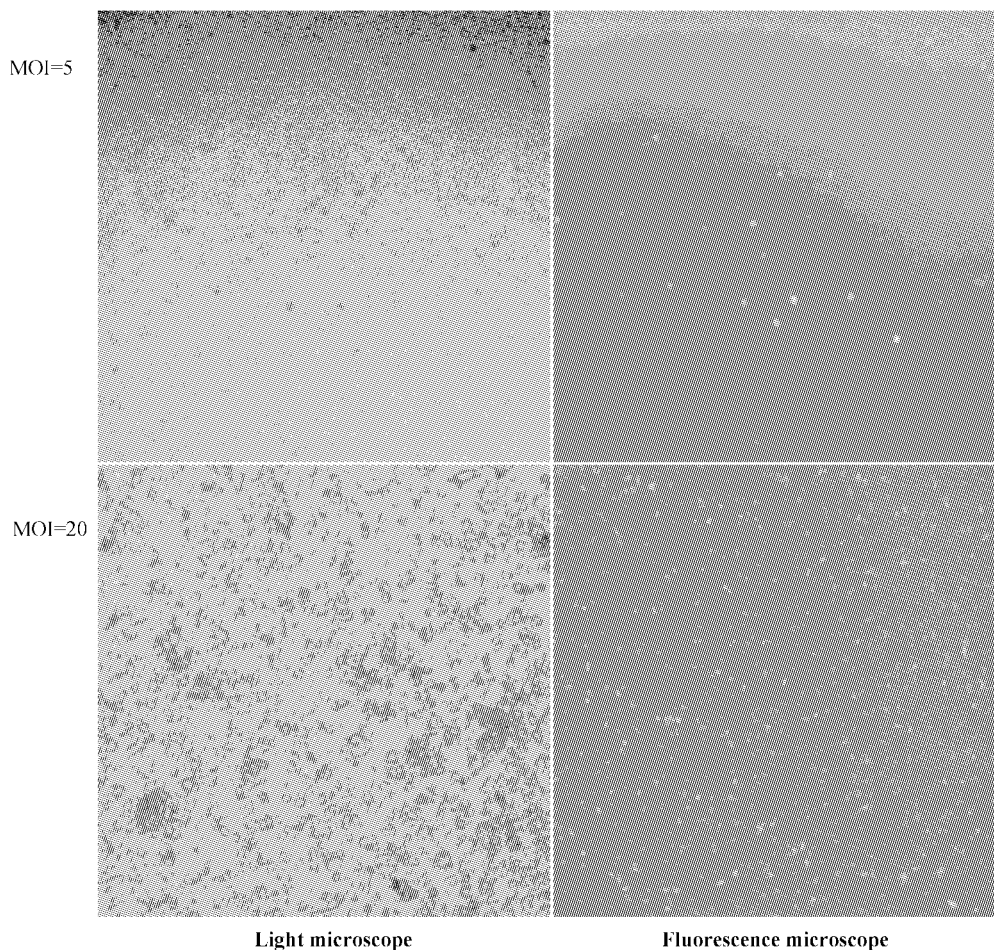


图 3 重组慢病毒感染后 DC 显微镜下表现(×100)

Fig 3 Observation of DC after recombinant lentivirus infection by microscopy(×100)

Bone marrow-derived DC were infected with recombinant lentivirus at MOI of 5 and 20 for 96 h. Through fluorescence microscope fluorescent cells were observed, while all DC were observed under light microscope.

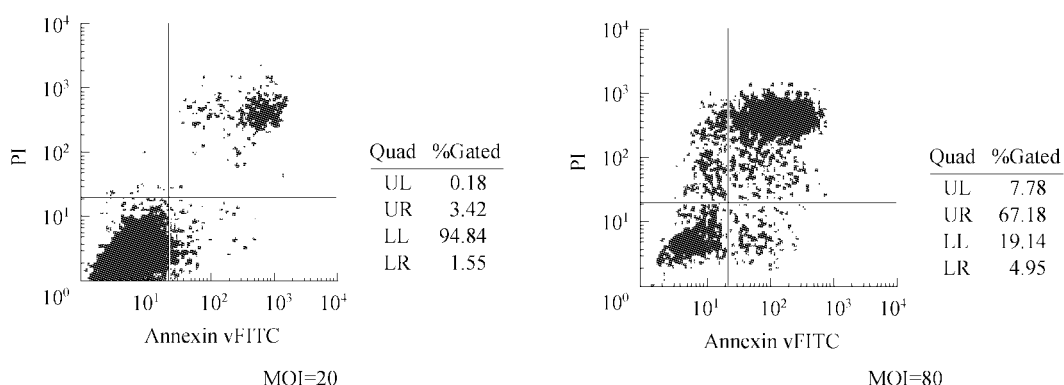


图 4 重组慢病毒感染后 DC 凋亡和坏死情况

Fig 4 Apoptosis and necrosis of DC after recombinant lentivirus infection

Bone marrow-derived DC were infected with recombinant lentivirus at MOI of 20 and 80 for 96 h. Cell apoptosis and necrosis were assessed by flow cytometry using annexin V and propidium iodine staining, respectively. Data were representative of three independent experiments.

重组慢病毒有效地阻断 CD80 和 CD86 的表达 CD80 和 CD86 基因 RNA 干扰慢病毒均以

MOI = 20 同时感染 DC,脂多糖刺激后 48 h 后,流式细胞仪检测细胞表面分子的表达。同时感染

CD80 和 CD86 基因 RNA 干扰慢病毒的 DC, 与空白对照组 DC 相比, CD80 的表达下降了 $(81.97 \pm 2.97)\%$ ($P < 0.05$), CD86 的表达下降了 $(81.39 \pm 3.00)\%$ ($P < 0.05$)。阴性对照组中 CD80 和 CD86 的表达未受到影响(表 2)。

表 2 重组慢病毒对 CD80、CD86、CD11c、MHC-II 表达阳性率影响

Tab 2 Expression of CD80, CD86, CD11c and MHC-II after infection with recombinant lentivirus (%)

Group	CD80	CD86	CD11c	MHC-II
Blank control	78	81	88	90
Negative control	74	79	85	89
Co-infected by lentiviruses targeting CD80 and CD86	14	18	87	88

讨 论

受体对同种异体移植物的排斥反应是由 T 细胞的活化引起。T 细胞激活需要双信号, 第一信号是受体 T 细胞表面 TCR-CD3 复合物同抗原提呈细胞(antigen presenting cell, APC)上的 MHC-II 类抗原肽复合物结合; 第二信号来自 APC 如 DC 上的协同刺激分子与受体 T 细胞表面的相应受体的结合。若缺乏共刺激信号, 则 T 细胞被诱导凋亡或无能, 这其中 CD80/CD86-CD28 是最重要的一条共刺激通路^[7]。如果阻断这一环节, 那么 T 细胞增殖及排斥反应的发生将得到有效遏制, 从而诱导抗原特异性的免疫耐受。如果应用 CD80/CD86 抗体中和 DC 表面分子, 由于抗体的效价不一, 并且在体内反复应用会导致针对此抗体的免疫反应, 产生中和抗体, 影响其对 CD80/CD86 分子的阻断效果; 反义寡核苷酸技术存在毒性较大, 成本高, 特异性差, 抑制效率低等缺点; 传统的基因工程方法修饰 DC 操作费时费力, 而且常用的载体如腺病毒等不可避免的具有免疫原性, 致使 DC 表达共刺激分子而成为具有免疫刺激性的成熟 DC, 促使反应性 T 细胞活化^[8]。随着 RNA 干扰技术的问世, 为体外加工、改造 DC 开辟了新的途径。

RNA 干扰具有快速、有效、容易操作、序列特异性强等优点^[9], 在某种程度上可以替代传统的反义核苷酸技术和基因敲除技术。Laderach 等^[10]应用体外合成针对 NF- κ B1 的 siRNA 转染人单核细胞来源的 DC, 可特异有效地降解 NF- κ B1 的 mRNA, 抑制 NF- κ B1 蛋白的产生, MHC 和共刺激分子未受到影响, 但 IL-12 p40 基因被阻断, 导致 IL-12 α 分泌减少。Hill 等^[11]使用体外合成针对 IL-12 p35 的

siRNA 转染小鼠骨髓源性 DC, 可有效地阻断 IL-12 p35 基因的表达, 抑制 IL-12 p70 的合成, 同时促进了 IL-10 的分泌, 诱导混合淋巴细胞低反应。

基于目前尚无将 RNA 干扰技术应用于 DC 表面 CD80 和 CD86 的研究报道, 我们在筛选出 CD80 和 CD86 基因 RNA 干扰的有效靶序列后, 构建表达 shRNA 慢病毒载体, 以进一步研究沉默 CD80 和 CD86 基因对诱导免疫耐受的影响并探讨其机制。本研究所采用的慢病毒载体系统中, pGCL 质粒中含有 U6 启动子, 能在宿主细胞中持续表达 shRNA, 同时该质粒能表达由 CMV 启动子驱动的荧光蛋白(GFP/RFP)。可用于病毒包装时转染效率, 以及感染宿主细胞的感染效率的检测。pHelper1.0 质粒中含有 HIV 病毒的 gag 基因, 编码病毒主要的结构蛋白; pol 基因, 编码病毒特异性的酶; rev 基因, 编码调节 gag 和 pol 基因表达的调节因子。pHelper2.0 质粒中含有单纯疱疹病毒来源的 VSVg 基因, 提供病毒包装所需的衣壳蛋白。前期实验我们使用化学合成 siRNA 有一定的局限性, 转染效率不高, 持续时间短, 不适合体内实验^[3]。慢病毒载体是一种复制缺陷型逆转录病毒载体, 具有许多优点, 能够感染非分裂期细胞和分裂期细胞, 并具有低免疫原性, 而且病毒的遗传物质能够整合到宿主的基因组。病毒的 VSVg 外壳使载体病毒颗粒具有更强的稳定性, 慢病毒载体 RNA 干扰作用持久, 同时扩大了载体感染细胞的范围^[12]。

本实验成功构建了 CD80 和 CD86 基因 RNA 干扰慢病毒载体, 并发现适合慢病毒感染 DC 的 MOI 值为 20, 且重组慢病毒明显抑制 DC 表面 CD80 和 CD86 的表达。在受体体内复杂的细胞因子微环境中, DC 迅速上调 MHC 和共刺激分子的表达, 使得其从“致耐受性”向“致免疫性”转变, 从而导致耐受诱导失败^[13], 我们在实验中加入脂多糖, 可以促进空白对照组 DC 成熟, 但不能上调共感染 DC 的 CD80 和 CD86 的表达。这为进一步研究 CD80 和 CD86 基因在移植免疫耐受中的作用机制和移植动物基因治疗奠定了基础。

致谢 上海吉凯基因化学技术有限公司提供了技术支持。

参 考 文 献

- [1] Frauwirth KA, Thompson CB. Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation[J]. *J Clin Invest*, 2002, 109(3): 295-299.
- [2] Hannon GJ. RNA interference[J]. *Nature*, 2002, 418(6 894): 244-251.

(下转第 493 页)