

文章编号: 1002-2694(2005)09-0783-05

一个包含 HCV IRES 的高效真核双顺反子表达载体的构建*

欧山海, 吴婷, 何水珍, 伍小路, 郑舟, 张军, 夏宁邵**

摘要:目的 利用丙型肝炎病毒(HCV)的内部核糖体进入位点(IRES)元件构建一个新的真核双顺反子表达载体。方法 克隆包含 HCV 5' 非编码区 18nt 开始到 HCV CORE 区编码基因的 32nt 的 IRES 序列替换商用载体 pIRES 中脑心肌炎病毒(EMCV)的 IRES 序列, 构建真核双顺反子表达载体 pCVIR, 再将绿色荧光蛋白(GFP)和乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)基因分别克隆到 pIRES 和 pCVIR 中的 IRES 的上下游, 用流式细胞仪检测 GFP 的表达强度, ELISA 法检测 HBsAg 的表达, 比较两者的表达效率。结果 pCVIR 载体对 IRES 下游 GFP 和 HBsAg 的表达效率高于 pIRES 载体。结论 构建了一个高效的真核双顺反子表达载体。

关键词: 丙型肝炎病毒; 内部核糖体进入位点; 真核表达载体; 双顺反子

中图分类号: R373.2 文献标识码: A

Construction of an effective eukaryotic bi-cistronic expression vector containing HCV internal ribosome entry site

OU Shan hai, WU Ting, HE Shui zhen, WU Xiao lu, ZHENG Zhou, ZHANG Jun, XIA Ning shao

(The Research Center for Medical Molecular Virology of Fujian Province, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

ABSTRACT: In this paper, a new eukaryotic bi-cistronic expression vector containing Hepatitis C Virus(HCV) internal ribosome entry site (IRES) expressing two foreign genes from one mRNA was constructed. The sequence starting from the 5' untranslated region of 18nt to 32nt in HCV core coding region was cloned and then the encephalomyocarditis virus (EMCV) IRES sequence in the commercial vector pIRES was substituted to construct a new vector pCVIR. Green fluorescent protein (GFP) and Hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) coding genes were inserted upstream and downstream of IRES sequence. The fluorescence intensity of GFP and HBsAg were determined by flow cytometry and ELISA respectively., thus, the expression efficiency of the two vectors, pCVIR and pIRES could be compared. The experimental results showed that the vector pCVIR could translate the GFP and HBsAg genes downstream of its HCV IRES sequence more efficiently without impairing the expression of genes upstream of IRES sequence than the vector pIRES. It is concluded that a new eukaryotic bi-cistronic expression vector containing HCV IRES was constructed successfully by the method described above.

KEY WORDS: Hepatitis C virus; internal ribosome entry site; eukaryotic expression vector; bicistronic

真核双顺反子表达载体适用于双基因的同时表达, 即在两个蛋白编码序列之间插入内部核糖体进入位点(internal ribosome entry site, IRES), 转录后为同一条 mRNA; 翻译时, IRES 上游基因翻译起始遵循一般的真核生物基因的翻译起始规律(即帽结构依赖方式), 而 IRES 下游基因则通过 IRES 引导核糖体进入, 启动基因的翻译, 从而实现两个基因的同时表达^[1-4]。由于两个基因翻译自同一条 mRNA, 表达出的蛋白在时间和空间上接近, 尤适用于研究相互作用的两个蛋白质或通过报告基因追踪待检测蛋白的转录及表达, 也可作为多表位 DNA 疫

苗的表达载体。

目前, 小 RNA 病毒家族中的脑心肌炎病毒(EMCV)IRES 序列被认为有比其他病毒来源(包括 HAV, 脊髓灰质炎病毒和鼻病毒等)的 IRES 更高的翻译效率^[5], 因此 EMCV IRES 被广泛应用于构建真核表达质粒、反转录病毒和腺病毒双顺反子载体^[6-14]。当以 CMV(巨细胞病毒)的立即早期启动子启动整条 mRNA 翻译时, IRES 上游的基因表达

* 福建省科技重大专项(2004YZ01-01)

** 通讯作者

作者单位: 厦门大学福建省医学分子病毒学研究中心, 厦门 361005

往往强于下游基因的表达^[15],因此在构建双顺反子载体时,往往将目的基因插入到其上游,而将报告基因或抗性筛选基因置于其下游,使用双顺反子表达载体可以保证目的基因和报告基因表达的不同步性。由于IRES翻译效率与其下游基因的5'端的RNA结构有很大关系,某些情况下二者形成稳定的二级结构会明显阻碍核糖体40s亚单位与IRES的相互作用,从而使翻译效率大为减弱^[16]。我们在研究过程中也曾发现某些基因置于EMCV IRES下游表达效率较低,因此本研究尝试用丙型肝炎病毒(HCV)来源的IRES替代EMCV的IRES,构建一个新的真核双顺反子表达载体pCVIR。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株和细胞株 质粒pEGFP(含绿色荧光蛋白基因GFP)及pIRES购自Clontech公司;pcDNA3.1-S(含乙肝表面抗原HBsAg, adw2亚型, genBank编号: AF233236)由本实验室自行构建并保存;质粒pSPI/ΔS(含HCV全长cDNA序列)由Seeger博士惠赠;pMD18T克隆载体购自TAKARA公司;DH5α大肠杆菌菌株由本实验室保存;BHK21(ADCC CCL210)细胞株购自ATCC。

1.2 HCV IRES的获得及质粒pCVIR、pCVIR3的构建 从HCV 5' UTR的第18nt开始到UTR末端共341nt为HCV的IRES,其后紧随HCV CORE区编码基因。该段编码区的前端32nt对HCV IRES翻译效率的影响有不同报道^[15],因此我们分别扩增出3'端延伸到HCV CORE区+32nt和+3nt的两种序列,命名为CVIR与CVIR3。

以pSPI/ΔS为模板设计引物(表1)。分别用

相应引物进行PCR,即可得到CVIR与CVIR3(PCR反应条件:94℃ 1min, 55℃ 30s, 72℃ 30s, 循环20次)。回收PCR片段,克隆到pMD18T载体上,得到pMD18T-CVIR和pMD18T-CVIR3,测序证实无误。

以EcoR I和Xba I双酶切pMD18T-CVIR和pMD18T-CVIR3质粒,亚克隆到pIRES质粒上,即可得到以HCV IRES替换EMCV IRES的双顺反子表达载体,命名为pCVIR和pCVIR3。

1.3 pIRES、pCVIR和pCVIR3系列衍生质粒的构建

1.3.1 HBsAg编码基因的获得 以质粒pcDNA3.1-S为模板,以相应引物对(表1)进行PCR(94℃ 1min, 55℃ 50s, 72℃ 50s, 循环20次),即得到S基因,克隆到pMD18T载体上,得到pMD18T-S,测序证实序列正确。

1.3.2 EGFP编码基因的获得 以pEGFP质粒为模板,以相应引物对进行PCR(94℃ 1min, 55℃ 50s, 72℃ 50s, 循环20次),即得到GFP基因,克隆到pMD18T载体上,得到pMD18T-G,测序证实序列正确。

1.3.3 pS-EMIR-G的构建 即pIRES载体的EMCV IRES上游插入HBsAg基因,下游插入GFP基因。具体是:以Xho I和Sal I双酶切pMD18T-G,得到GFP片段,插入到以Sal I酶切的pIRES载体上,得到pEMIR-G;再以Xho I和Sal I双酶切pMD18T-S质粒,得到S基因,插入到以Xho I单酶切的pIRES-G质粒上,即得到pS-EMIR-G。

表1 PCR用引物序列

Table 1 The primers used in PCR

扩增片段	引物名称	引物序列	酶切位点
CVIR	5URF	GAATTC GCG ACA CTC CAC CAT AG AT	EcoR I
	5URR	TCTAGA CCATGG TTT TTC TTT GAG GTT TAG	Xba I, EcoR V
CVIR3	5URF	GAATTC GCG ACA CTC CAC CAT AG AT	EcoR I
	5UR3R	TCTAGA CCATGG TGC ACG GTC TAC G	Xba I, EcoR V
EGFP	EGXHOF	CTCGAG ATG GTG AGC AAG GGC GAG G	Xho I
	EGECORIR	GAATTC TTA CTT GTA CAG CTC GTC CAT	EcoR I
HBsAg	SXHOF	CTCGAG ATG GAG AAC ACA ACA TCA G	Xho I
	SORIR	GAATTC TCA AAT GTA TAC CCA AAG	EcoR I

1.3.4 pG-EMIR-S的构建 即pIRES载体的EMCV IRES上游插入GFP基因,下游插入HBsAg基因。具体是:以Xho I和Sal I双酶切

pMD18T-S,得到S片段,插入到以Sal I酶切的pIRES载体上,得到pEMIR-S;再以Xho I和Sal I双酶切pMD18T-G,得到GFP基因,插入到以

Xho I 单酶切的 pEMIR-S 质粒上, 即得到 pG-EMIR-S 质粒。

1.3.5 pS-CVIR-G 的构建 即 pCVIR 载体的 HCV IRES 上游插入 HBsAg 基因, 下游插入 EGFP 基因。具体是: 以 *Xho* I 和 *Sal* I 双酶切 pMD18T-G, 得到 GFP 片段, 插入到以 *Sal* I 酶切的 pCVIR 和 pCVIR3 载体上, 得到 pCVIR-G 和 pCVIR3-G; 再以 *Xho* I 和 *Sal* I 双酶切 pMD18T-S 质粒, 得到 S 基因, 插入到以 *Xho* I 单酶切的 pCVIR-G 质粒上, 即得到 pS-CVIR-G。

1.3.6 pG-CVIR-S 的构建 即 pCVIR 载体的 HCV IRES 上游插入 GFP 基因, 下游插入 HBsAg 基因。具体是: 以 *Xho* I 和 *Sal* I 双酶切 pMD18T-S, 得到 S 片段, 插入到以 *Sal* I 酶切的 pCVIR 和 pCVIR3 载体上, 得到 pCVIR-S 和 pCVIR3-S; 再以 *Xho* I 和 *Sal* I 双酶切 pMD18T-G, 得到 EGFP 基因, 插入到以 *Xho* I 单酶切的 pCVIR-S 质粒上, 即得到 pG-CVIR-S 质粒。

1.4 质粒转染细胞 参照脂质体 lipofectamine 2000 (Invitrogen) 的说明书进行。具体是: 在 24 孔板里铺 BHK21 细胞, 5×10^4 /孔, 待细胞完全贴壁, 细胞汇合率达 70~80% 左右时进行转染实验。取 1 μ g 各种待转染质粒与 2 μ L 脂质体 lipofectamine 2000 混合, 转染 BHK21 细胞, 48h 时进行各种检测。每种质粒皆作 4 孔重复, 取平均值进行比较。

1.5 流式细胞仪检测 GFP 的表达 细胞培养 48h 后, 胰酶消化, PBS 洗 1 遍, 重悬于 1ml PBS 中, 流式细胞仪 (Beckmar Coulter XL) 检测各质粒表达 EGFP 的效率 (Green cells%) 和荧光强度 (FI)。重复转染 3 次, 取平均值进行比较。

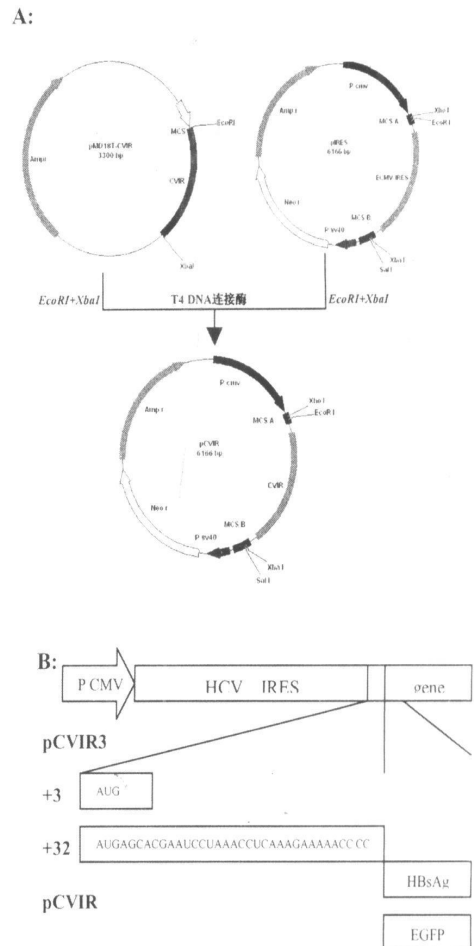
1.6 ELISA 检测 HBsAg 的表达 细胞培养 48h 后, 胰酶消化, PBS 洗 1 遍, 重悬于 200 μ l PBS 中, 冻融 3 次, 离心取上清, ELISA 法检测 HBsAg (北京万泰公司试剂盒, 参照说明书进行检测) 的表达情况。同时取 HBsAg 的标准品 (4ng/ml, 北京万泰公司) 也作系列梯度稀释进行检测, 其结果作出标准曲线, 其他样品所得数值根据标准曲线换算出相对的 HBsAg 的含量进行比较。重复转染 3 次, 取平均值进行比较。

2 结果

2.1 HCV 多肽编码序列对 HCV IRES 翻译效率的影响 关于 HCV IRES 的 3' 端应该延伸到 CORE 区编码序列的 +32nt 处还是 +3nt 处有不同的报道^[16]。为此, 我们首先扩增出 HCV 5' UTR 区第 18nt 开始到 CORE 区 +32nt 和 +3nt 的序列, 分别

命名为 CVIR 和 CVIR3, 用于替代 pIRES 中的 EMCV IRES 序列, 获得质粒 pCVIR 和 pCVIR3 (图 1A), 并在 CVIR 和 CVIR3 的下游插入 GFP 和 HBsAg 的编码基因, 构建质粒 pCVIR-G、pCVIR3-G、pCVIR-S 和 pCVIR3-S (图 1B), 检测 CVIR 和 CVIR3 对下游基因的翻译效率。结果表明, pCVIR-G 在 BHK21 中表达 GFP 的荧光强度高于 pCVIR3-G, 分别为 42.9 和 32.3, pCVIR-S 在 BHK21 中表达 HBsAg 的强度亦高于 pCVIR3-S, 分别为 0.9ng/ml 和 0.04ng/ml, 故我们采用 CVIR 进行后面的研究 (图 1C)。

2.2 不同 IRES 对上游及下游 EGFP 荧光强度的影响 在质粒 pS-EMIR-G、pG-EMIR-S、pS-CVIR-G、pG-CVIR-S 中, GFP 分别被置于 EMCV 及 HCV 的 IRES 的上、下游, 上游 GFP 直接从其上方的 CMV 启动子区被转录、翻译, 下游 GFP 的翻译依赖核糖体与 mRNA 中的 IRES 结合而被翻译。将四种质粒分别转染 BHK21 细胞, 以 pIRES 为阴性对照, 48h 后用倒置荧光显微镜观察 (图 2)。结果显示



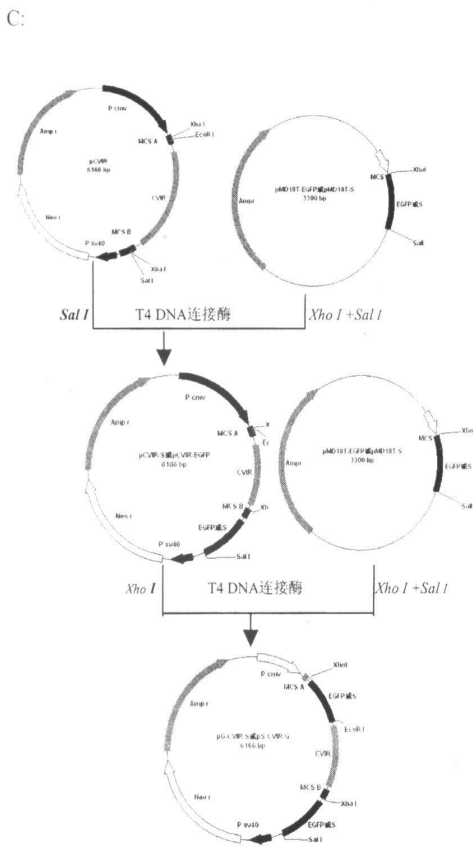


图1 质粒构建图谱

Fig 1 Construction of the plasmids

A: Construction of pCVIR; B: IRES region of pCVIR/
pCVIR3; C: Construction of pS-CVIR-G, pG-CVIR-S

当 GFP 位于 EMIR 下游时(pS-EMIR-G) 荧光几乎不可见, 而位于 CVIR 下游(pS-CVIR-G) 则可见较明显荧光。而 GFP 位于 IRES 上游时的荧光均较强, pG-CVIR-S 的荧光更强一些。

为了进一步定量 GFP 的荧光强度, 我们用流式细胞仪检测转染细胞表达的绿色荧光。结果(表 2, 图 3) 与荧光显微镜下的观察结果一致, GFP 位于 CVIR 下游时(pS-CVIR-G) 的荧光强度和阳性细胞比例均显著高于位于 EMIR 下游(pS-EMIR-G) ($P < 0.01$)。而 pG-CVIR-S 的荧光最强。

2.3 不同 IRES 对上游及下游 HBsAg 表达强度的影响 检测不同质粒转染 BHK21 细胞 48h 后, 细胞培养上清中 HBsAg 的含量。结果显示(表 3, 图 4), 与 GFP 的表达情况相似, 在 HCV 的 IRES 下游的 HBsAg 表达显著强于在 EMCV 的 IRES 下游($P < 0.05$)。而与 GFP 不同的是, pS-CVIR-G 的 HBsAg 的表达量不高于 pS-EMIR-G, 二者均高于 HBsAg 位于 IRES 下游时的表达量($P < 0.05$)。

3 讨论

在本研究中, 相对于 CVIR3 而言, CVIR 大大增强下游 HBsAg 的表达效率, 提示 HCV CORE 区前 33 个碱基的存在可能有利于核糖体与 HCV IRES 的结合。但 CVIR 与 CVIR3 下游的 GFP 翻译效率的差别远没有 HBsAg 明显, 提示基因的二级结构可能是更重要的影响因素。

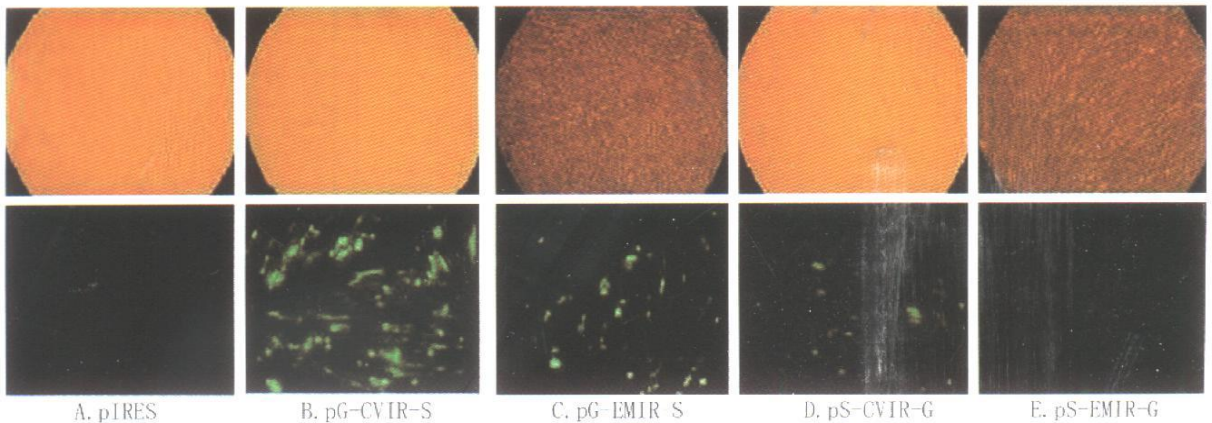


图2 转染不同质粒的 BHK21 细胞

Fig 2 BHK21 cell lines transfected with different vectors

Up line shows the cells observed under visible light; down line shows the cells observed through fluorescent microscope(100×)

表 2 各质粒 3 次转染 BHK21 细胞的 GFP 表达效率和平均荧光强度

Table 2 The expression efficiency and mean fluorescence intensity of GFP in BHK21 transfected with different plasmids at 3 different times

质粒	第 1 次转染结果		第 2 次转染结果		第 3 次转染结果		3 次结果平均值	
	Green cells (%)	FI	Green cells (%)	FI	Green cells (%)	FI	Green cells (%)	FI
pIRES	0.21	1.00	0.29	1.00	0.20	1.05	0.23	1.02
pS-EMIR-G	1.63	2.70	1.30	3.00	2.21	3.90	1.71	3.20
pS-CVIR-G	5.22	15.60	4.22	16.30	6.65	21.30	5.36	17.73
pG-EMIR-S	9.55	25.35	6.49	14.35	10.01	24.40	8.68	21.37
pG-CVIR-S	14.65	29.65	11.89	25.90	17.85	42.55	14.80	32.70

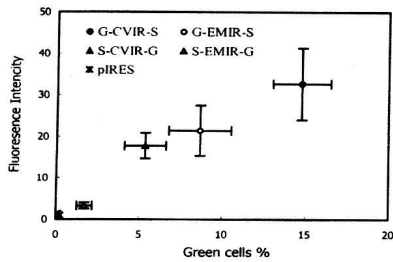


图 3 流式细胞仪检测转染不同质粒的 BHK21 细胞

Fig 3 BHK21 cell lines transfected with different vectors asayed by flow cytometry

表 3 各质粒 3 次转染 BHK21 细胞的 HBsAg 表达强度

Table 3 The expression of HBsAg in BHK21 transfected with different plasmids at 3 different times

Yields of rHBsAg (ng/ml)	第 1 次	第 2 次	第 3 次	3 次平均值
pIRES	0.05	0.04	0.04	0.04
pG-EMIR-S	0.57	1.12	1.30	1.00
pG-CVIR-S	1.57	5.90	3.31	3.59
pS-EMIR-G	16.50	31.52	26.98	25.00
pS-CVIR-G	11.49	25.38	20.82	19.23

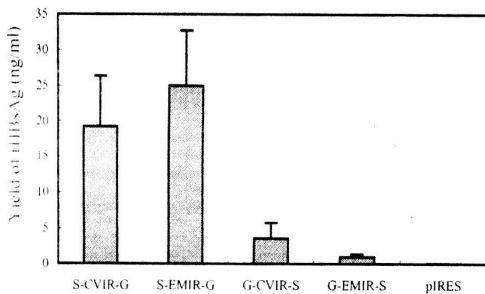


图 4 转染不同质粒的 BHK21 细胞裂解液中 rHBsAg 的含量

Fig 4 Yield of rHBsAg in BHK21 cell lines transfected with different vectors

将 CVIR 序列替代 pIRES 中的 EMCV IRES 序列, 构建了新的双顺反子表达载体 pCVIR。将 GFP 和 HBsAg 的编码基因分别插入到两种 IRES 的上/下游, 发现在 HCV IRES 的下游 GFP 和 HBsAg 的表达量均要显著高于在 EMCV IRES 的下游。比较 pS-CVIR-G 和 pS-EMIR-G, 前者 HBsAg 的表达量略低于后者, 提示其在 BHK21 细胞中的 mRNA 转录水平不高于后者, 但其 GFP 表达量显著高于后者, 提示 CVIR 下游的 GFP 的翻译效率高于 EMIR 下游。

在多数研究中, EMCV 的 IRES 比其他病毒来源的 IRES 更强地启动非帽结构依赖的翻译起始^[5]。然而本研究结果显示, HCV IRES 启动某些基因的翻译效率强于 EMCV IRES。这可能与下游基因 5' 端序列的结构有关, 其与 EMCV IRES 形成的二级结构较与 HCV 的 IRES 形成的二级结构更为复杂, 较不利于核糖体 40s 亚单位与 IRES 的结合, 从而降低了翻译效率。某种 IRES 对其下游基因翻译效率的高低并不是绝对的, 如果对下游基因的 5' 端做一些同义突变 (改变某些碱基, 但不改变氨基酸序列), 甚至从不同的酶切位点插入下游基因, 都有可能改变这一段 mRNA 的二级结构, 从而提高翻译效率^[16]。本研究结果表明, pCVIR 载体是一种有价值的真核双顺反子载体, 可以作为商业化的 pIRES 载体的一个有力补充。

参考文献

[1] Mountford PS, Smith AG. Internal ribosome entry site and dicistronic RNAs in mammalian transgenesis [J]. Trends Genet, 1995, 11 (5): 179- 184.
 [2] Pelletier J, Sonenberg N. Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA [J]. Nature, 1988, 334(6180): 320- 325.
 [3] Jang SK, Krausslich HG, Nicklin MJ, et al. A segment of the 59 non translated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation [J]. J Virol, 1988, 62 (8): 2636- 2643.

(下转第 832 页)

间隔增厚所致的细线形影。

5.2 心电图检查 T波改变15例,1度房室传导阻滞5例,频发室性早搏5例。

5.3 腹部B超检查 显示60例肝肿大、肝实质光点增粗,17例脾肿大。

6 并发症

皮肤损害67例,支气管炎和肺炎57例,继发性血小板减少51例,中毒性肝炎47例,肾损害41例,中毒性心肌炎19例,消化道出血、中毒性休克各7例,脑炎及脑膜炎3例,继发性尿崩症、弥散性血管内凝血(DIC)及多器官功能衰竭各1例,上述并发症中同时存在并发2种或以上系统脏器损害51例,占62.96%。

7 误诊情况

初诊误诊41例,误诊率50.61%,其中误诊为伤寒12例,支气管肺炎7例,流行性出血热5例,败血症4例,钩端螺旋体病3例,疟疾、麻疹、药物疹各2例,细菌性痢疾、病毒性肝炎、红斑狼疮、白血病各1例。

8 治疗及转归

8.1 药物与剂量 氯霉素成人用2g/d,小儿25~40mg/(kg·d),热退后减半,继续用7~10d。氟喹酸成人0.4g~0.6g/d,体温正常继续用7~10d。

8.2 治疗反应 氯霉素治疗50例(小儿7例),高热时每天的剂量作静脉滴注,48~96h体温开始下降后改为口服,7~

16d体温恢复正常;氟喹酸治疗31例,发热时作静脉滴注,42~92h体温开始下降后剂量减半改为口服,7~13d体温恢复正常。毒血症状严重者,联用肾上腺皮质激素地塞米松10mg/d,疗程5~7d。

8.3 转归81例患者除死于多器官功能衰竭1例外,均痊愈出院。死于多器官功能衰竭1例病理解剖诊断:肺梗死,支气管肺炎并部分支气管坏死;肺门淋巴结急性炎症;肺水肿和肺出血;轻度化脓性脑膜炎、脑水肿和脑出血;急性坏死性脾炎;间质性肾炎;肝炎;胰腺炎;胃肠道急性浅表性炎症;急性皮肤炎症;肾上腺皮质出血;神经细胞变性。

9 讨论

本组病例来自湘西地区恙虫病流行疫区内8县1市,有野外接触史和作业史,具备恙虫病四大临床特征:持续高热;全身浅淋巴结肿大,出现皮疹、虫咬溃疡或焦痂;外斐反应OXk凝集效价 ≥ 160 ~ ≥ 2580 ;查见恙虫病东方体。

其最显著临床特点是:①热程长,8~73d,平均26.7d,超过1月者7例,为持续性,热型以弛张热多见;②外斐反应OXk,出现时间早,病程第二天即 ≥ 160 以上,消失时间迟,病程64d仍为 ≥ 640 以上;③毒血症状重,且有多系统多脏器损害及少见的并发症,如中毒性休克、弥散性血管内凝血(DIC),继发性尿崩症等;④2个焦痂或溃疡并不少见。以上改变,可能与恙虫病毒株种类不同有关。

收稿日期:2004-09-18;修回日期:2005-01-25

(上接第787页)

[4]詹林盛,饶林,彭剑淳,等.HCV IRES介导萤火虫荧光素酶翻译的双顺反子载体的构建与在小鼠体内的表达[J].中国生物化学与分子生物学报,2004,20(3):330-334.

[5]Borman AM, Mercier PL, Girard M, et al. Comparison of picornaviral IRES driven internal initiation of translation in cultured cells of different origins[J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25(5): 925-932.

[6]Morgan RA, Couture L, Elroy-Stein O, et al. Retroviral vectors containing putative internal ribosome entry sites: Development of a polycistronic gene transfer system and applications to human gene therapy[J]. Nucleic Acids Res, 1992, 20(6): 1293-1299.

[7]Adam MA, Ramesh N, Miller AD, et al. Internal initiation of translation in retroviral vectors carrying picornavirus 5' nontranslated regions[J]. J Virol, 1991, 65(9): 4985-4990.

[8]Okada H, Miyamura K, Itoh T, et al. Gene therapy against an experimental glioma using adenovirus associated virus vectors[J]. Gene Ther, 1996, 3(11): 957-964.

[9]Rees S, Coote J, Stables J, et al. Bicistronic vector for the creation of stable mammalian cell lines that predisposes all antibiotic resistant cells to express recombinant protein[J]. Biotechniques, 1996, 20(1): 108-110.

[10]Urabe M, Hasumi Y, Ogasawara Y, et al. A novel dicistronic AAV vector using a short IRES segment derived from hepatitis C virus genome[J]. Gene, 1997, 200(1): 157-162.

[11]Sharma S, Miller PW, Stolina M, et al. Multicomponent gene therapy

py vaccines for lung cancer: Effective eradication of established murine tumors in vivo with interleukin27/herpes simplex thymidine kinase transduced autologous tumor and ex vivo activated dendritic cells[J]. Gene Ther, 1997, 4(12): 1361-1370.

[12]Fan L, Drew J, Dunckley MG, et al. Efficient coexpression and secretion of antatherogenic human apolipoprotein AI and lecithin2 cholesterol acyltransferase by cultured muscle cells using adenovirus plasmid vectors[J]. Gene Ther, 1998, 5(10): 1434.

[13]Pizzato M, Franchin E, Calvi P, et al. Production and characterization of a bicistronic Moloney2 based retroviral vector expressing human interleukin 2 and herpes simplex virus thymidine kinase for gene therapy of cancer[J]. Gene Ther, 1998, 5(7): 1003-1007.

[14]Okada H, Giezeman2Smits KM, Tahara H, et al. Effective cytokine gene therapy against an intracranial glioma using a retrovirally transduced IL24 plus HSVtk tumor vaccine[J]. Gene Ther, 1999, 6(2): 219-226.

[15]Hiroyuki Mizuguchi, Zhili Xu, Akiko Ishii2Watabe, et al. IRES2 dependent second gene expression is significantly lower than cap2 dependent first gene expression in a bicistronic vector[J]. Molecular Ther, 2000, 1(4): 376-382.

[16]Rijnbrand R, Bredenbeek PJ, Haasnoot PC, et al. The influence of downstream protein2 coding sequence on internal ribosome entry on hepatitis C virus and other flavivirus RNAs[J]. RNA, 2001, 7(4): 585-597.

收稿日期:2005-02-18;修回日期:2005-05-08