

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.09.006
网络首发 http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20190301.1547.036.html(2019-03-04)

兔 p38MAPK 基因沉默腺病毒载体构建及体外干扰效率的鉴定^{*}

全 钢¹,贾锐宁²,于 果²,许尧祥²,岳 金²,肖文林^{2△}
(1.新疆生产建设兵团第四师医院口腔颌面外科,新疆伊宁 835000;2.青岛大学附属医院口腔科/
青岛大学口腔医学院/青岛大学附属医院山东省教育厅口腔重点实验室,山东青岛 266555)

[摘要] 目的 构建并筛选 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38MAPK)基因沉默腺病毒载体,为进一步研究及应用 p38MAPK 基因沉默进行瘢痕增生基因治疗奠定基础。**方法** 依据兔 p38MAPK 基因的 cDNA 序列,设计并合成 3 对干扰序列,并对腺病毒进行包装。分别将以上 3 对双链 DNA oligo 退火后连入 pDC316-ZsGreen-shRNA 载体,经 PCR 及测序鉴定后,将以上质粒分别与包装质粒混合物共转染 HEK293A 细胞,包装产生病毒颗粒。各组病毒载体转染兔皮肤成纤维细胞后,运用实时荧光定量 PCR(real-time PCR)检测 p38MAPK 表达水平。**结果** PCR 和测序证实目的双链 DNA oligo 片段已被准确克隆到 pDC316-ZsGreen-ShRNA 载体;real-time PCR 检测到各组慢病毒感染兔皮肤成纤维细胞后均可以明显抑制 p38MAPK mRNA 的表达($P<0.05$)。以 AD-shRNA-P38MAPK-1 组抑制效果最明显。**结论** 成功构建并筛选出针对 p38MAPK 的最有效 RNAi 腺病毒表达载体;构建的腺病毒载体可以抑制兔皮肤成纤维细胞 p38MAPK 的表达。

[关键词] p38 丝裂原活化蛋白激酶;基因沉默;腺病毒载体;瘢痕增生;成纤维细胞
[中图法分类号] R782.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)09-1467-05

Construction of rabbit p38MAPK gene silencing adenovirus vector and its identification of in-vitro interference efficiency^{*}

QUAN Gang¹,JIA Kaining²,YU Guo²,XU Yaoxiang²,YUE Jin²,XIAO Wenlin^{2△}
(1.Oral and Maxillofacial Surgery,Xinjiang Production And Construction Corps Fourth Division Hospital,Yining,Xinjiang 835000,China;2.Department of Stomatology,the Affiliated Hospital of Qingdao University/ School of stomatology,Qingdao University/Key Laboratory of Stomatology, Education Department of Shandong Province,the Affiliated Hospital of Qingdao university.Qingdao,Shandong 266555,China)

[Abstract] **Objective** To construct and screen the p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK) gene silencing adenovirus vector,which lays the foundation for further research and application of p38MAPK gene silencing for scar hyperplasia gene therapy. **Methods** According to the cDNA sequence of rabbit p38MAPK gene,3 pairs of interference sequences were designed and synthesized,and the adenovirus was packaged. The 3 pairs of double-stranded DNA oligo were annealed and ligated into pDC316-ZsGreen-shRNA vector. After PCR and sequencing,the above plasmids were co-transfected into HEK293A cells with packaging plasmid mixture,and packaged to produce virus particles. After each group of virus vectors transfected rabbit skin fibroblasts,the expression level of p38MAPK was detected by real-time quantitative PCR (real-time-PCR). **Results** PCR and sequencing confirmed that the target double-stranded DNA oligo fragment was cloned into pDC316-ZsGreen-ShRNA vector. Real-time-PCR detected that the expression of p38MAPK mRNA was significantly inhibited by lentivirus infection of rabbit skin fibroblasts in each group ($P<0.05$). The inhibitory effect was most pronounced in the AD-shRNA-P38MAPK-1 group. **Conclusion** A p38MAPK gene silencing adenovirus vector was successfully constructed. The adenovirus vector can inhibit the expression of p38MAPK in the rabbit skin fibroblasts.

[Key words] p38 mitogen-activated protein kinase;gene silencing;adenovirus vector;cicatrization;fibroblasts

尽管唇裂修复手术缝线不断更新、术式不断改进,但是唇裂术后瘢痕甚至瘢痕的增生不仅影响患者面部的美观,甚至对患者的心理造成不良影响。基因治疗用于改善伤口修复方面是一个新的概念,其为从

^{*} 基金项目:山东省自然科学基金资助项目(ZR2015HM022)。 作者简介:全钢(1969—),主治医师,专科,主要从事口腔颌面外科软硬组织损伤的临床和基础研究。 △ 通信作者,E-mail:wenlinxiao@yeah.net。

表 1 p38MAPK 的 shRNA 序列

DNA 链	5'-3'
p38MAPK-1-F	GCC TGA CCT ATG ATG AAG TTT CAA GAG AAC TTC ATC ATA GGT CAG GCT TTT TT
p38MAPK-1-R	GAT CAA AAA AGC CTG ACC TAT GAT GAA GTT CTC TTG AAA CTT CAT CAT AGG TCA GGC
p38MAPK-2-F	GCG GCT ACT CAA ACA TAT GAT TCA AGA GAT CAT ATG TTT GAG TAG CCG TTT TTT
p38MAPK-2-R	GAT CAA AAA ACG GCT ACT CAA ACA TAT GAT CTC TTG AAT CAT ATG TTT GAG TAG CCG C
p38MAPK-3-F	GGC AGA TCT GAA CAA CAT TTT CAA GAG AAA TGT TGT TCA GAT CTG CCT TTT TT
p38MAPK-3-R	GAT CAA AAA AGG CAG ATC TGA ACA ACA TTT CTC TTG AAA ATG TTG TTC AGA TCT GCC

F:正向;R:反向

根本上防治瘢痕的增生性病变提供了可能。如果不针对特定的因子突变位点进行基因敲除,可能引起皮肤正常发育紊乱甚至动物死亡。因此,研究伤口愈合的理想模型是于局部伤口中应用基因转导使某种基因敲除或过表达,来观察其对伤口修复机制的影响。鉴于以往的实验研究结果可知,腺病毒是针对皮肤瘢痕进行基因治疗的理想载体。本实验的目的是构建 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase,p38MAPK)基因沉默病毒载体,为唇裂术后瘢痕增生的基因治疗提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料 (1)动物:新西兰兔 64 只,购自青岛康大生物科技有限公司。(2)仪器与试剂:冷冻高速离心机购自美国 Thermo fisher 公司,DNA 电泳系统、凝胶成像系统购自美国 Bio-Rad 公司,M199 液体培养基购自美国 Sigma 公司,T4 DNA Ligase、Pst I、BamH I 购自美国 NEB 公司,胎牛血清(Gibco)、HEK293A 细胞株购自中国科学院上海细胞库,DH5a 感受态细胞、小量质粒抽提试剂盒、Trans2K Plus II DNA Marker 购自北京全式金生物公司,DNA 测序购自上海生工生物公司,腺病毒干扰载体质粒购自北京欧林格生物公司,shRNA 片段合成购自南京金斯瑞生物公司,Qiagen 大规模质粒抽提试剂盒购自德国 Qiagen 公司,pDC316-ZsGreen-ShRNA 腺病毒试剂盒购自美国 Biovector 公司。

1.2 方法

1.2.1 pDC316-ZsGreen-ShRNA 重组质粒的构建 利用 p38MAPK 序列 cDNA 文库设计 shRNA 序列,经 Blast 表明其与小鼠其它 cDNA 序列不同源,合成 3 条含干扰序列的双链 DNA oligo。根据 p38MAPK 序列设计 shRNA,合成 3 个 shRNA 片段,合成序列见表 1。DNA 片段经由退火缓冲液完全退火后,3 对片段分别用 T4 连接酶将其与 pDC316-shRNA-ZsGreen 连接起来。将 10 μL 过夜连接产物转化 100 μL 感受态细胞,涂于含氨苄西林的 LB 培养基上,37℃ 恒温培养箱培养过夜。在 5 mL,100 μg/mL Ampicillin 抗性的 LB 培养液中分别挑取 1 个单菌落接种培养,250 r/min,37℃ 恒温摇床培养过夜。随后抽提质粒,分别用 BamH I 和 EcoR I 做酶切鉴定。构建的 3 组重组质粒分别命名为 pDC316-ZsGreen-ShRNA-1、2、3。

1.2.2 AD-shRNA-p38MAPK 腺病毒病毒包装 将

HEK293A 细胞种在面积为 10 cm² 培养皿中,传代培养。使用血球计数板计数,调整细胞密度后重新接种于 6 孔板中。用 500 μL 无血清稀释培养基对 4 μg pDC316-ZsGreen-ShRNA 重组质粒、10 μg Pshutter-CMV、10 μg pAdenoviral vector 稀释,充分混匀。加入 30 μL Lipofectamine3000 脂质体共转染,室温静置 20 min。将转染复合物逐滴加入 HEK293A 细胞培养皿中。第 2 天利用完全培养基对去除含 DNA-脂质体复合物进行培养,48~72 h 可产生大量病毒。对病毒进行收集,使用 0.45 μm 滤器进行过滤 4℃、10 000 r/min 超速离心 2 h 后弃上清液,沉淀物为 p38MAPK 基因 RNAi 腺病毒载体将沉淀下的载体分装后,保存于-80℃ 冰箱。将腺病毒载体分为 3 组,分别为 AD-shRNA-p38MAPK-1、AD-shRNA-p38MAPK-2、AD-shRNA-p38MAPK-3。将纯化的病毒倍比稀释后转染 HEK293A 细胞,48 h 荧光显微镜观察荧光;稀释病毒上清液的体积均为 10⁷ μL。将 HEK293A 细胞放于 12 孔培养板中,混匀后培养于 37℃ CO₂ 孵箱。24 h 后添加 100 μL 完全培养基。4 d 后观察荧光表达情况。随着稀释倍数的增加,荧光细胞数减少。换算公式:滴度(TU/mL)=荧光细胞个数/病毒原液量

1.2.3 分离培养兔皮肤成纤维细胞 用水合氯醛将新西兰兔麻醉后俯卧位固定,乙醇棉球消毒脱毛区后切取约 2 cm×3 cm 的皮肤。放于 250 U/mL 双抗生理盐水中浸泡灭菌 30 min,而后刮去皮下脂肪等。用 PBS 洗涤数遍,剪成约 1 mm³ 左右的皮片。常温下用混合酶消化 45 min,持续振荡。细胞沉淀重悬后接种培养。弃培养基,先用 PBS 洗 1 遍,而后加入 1~2 mL 胰酶,消化。1 000 r/min 离心 3 min,弃上清液,加入完全培养基培养传代。

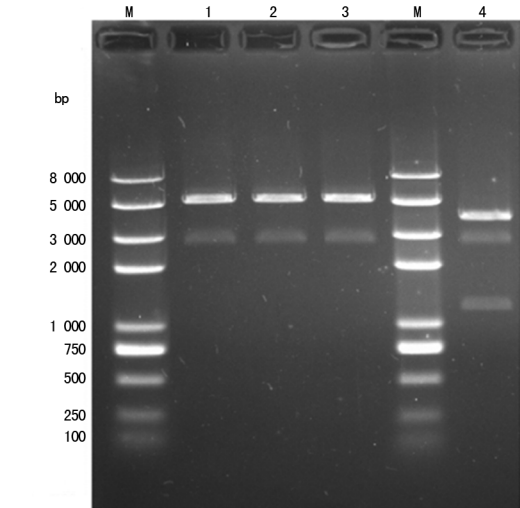
1.2.4 实时荧光定量 PCR(real-time PCR)检测腺病毒感染皮肤成纤维细胞后 p38MAPK 的干扰效率 调整细胞密度而后重新接种于 6 孔板中,培养过夜,细胞贴壁后感染。感染前 2 h 换液。按照每孔感染复数(MOI)=1:5 比例加入病毒。感染 48 h 后,参照说明书进行反转录 PCR(RT-PCR)检测。每一标本分别放入 3 个复孔中,得出每组的 Ct 值,从而计算出每组的相对表达水平。所有实验重复 3 次。RT-PCR 检测的目的基因引物序列的正义链:5'-GGG ACC TAA AGC CTA GTA AC-3';反义链:5'-CGA CCG ACC AAA TAT CAA-3'。内参 β-actin 引物序列正义

链:5'-TGG CTC TAA CAA GTC CGC CTA G-3';反义链:5'-AGT GCG ACG TGG ACA TCC G-3'。

1.3 统计学处理 采用 SPSS18.0 统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间使用两独立样本 t 检验进行比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

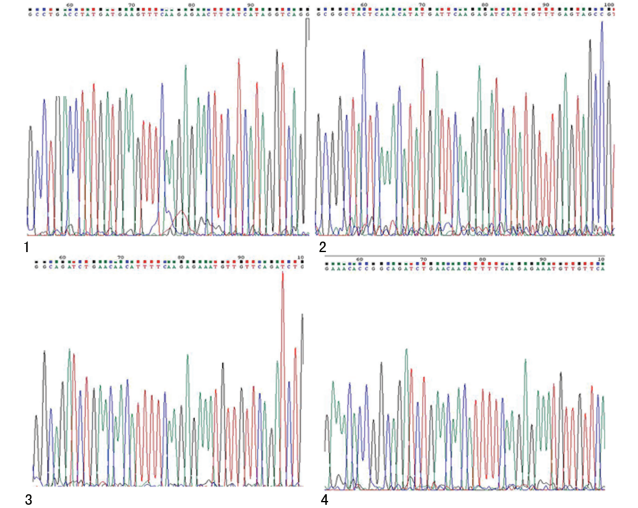
2.1 重组质粒的酶切鉴定及测序结果 将重组质粒分别以 BamH I 和 EcoR I 做酶切鉴定,鉴定酶切图谱见图 1。挑取酶切鉴定正确的阳性菌测序,测序峰图见图 2。酶切鉴定结果及测序结果说明,3 个 pDC316-shRNA-ZsGreen 质粒均完全符合设计要求。



M:Marker;1、2、3:构建的质粒;4:空白对照组
图 1 重组质粒 PCR 酶切鉴定图

2.2 转染后 HEK293A 的细胞效应 pDC316-ZsGreen-shRNA-p38MAPK-1、pDC316-ZsGreen-shRNA-p38MAPK-2、pDC316-ZsGreen-shRNA-p38MAPK-3 载体分别共转染 HEK293A 细胞后,HEK293A 细胞变圆,部分融

合,出现多核复合体,见图 3。
2.3 兔皮肤成纤维细胞分离培养 显微镜下,原代兔上唇皮肤成纤维细胞,大致呈梭形或纺锤形,见图 4。
2.4 real-time PCR 检测腺病毒感染目的细胞后 p38MAPK 的干扰效率 校准基因为管家基因 β -actin 作为空白对照组,兔上唇成纤维细胞 p38MAPK mRNA 的相对表达水平定为 1;所有标本重复 3 次,计算 $-\Delta\Delta Ct$,以平均相对表达水平为 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算其他各病毒转染组兔上唇成纤维细胞 p38MAPK 的 mRNA 的相对表达水平。与空白对照组比较,各组 p38MAPK mRNA 相对表达水平均有不同降低,其中 AD-shRNA-p38MAPK-1 组的 p38MAPK 的 mRNA 表达下降,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 5。



1、2、3:重组质粒 pDC316-ZsGreen-shRNA-p38MAPK-1、2、3;4:重组质粒 NC 组
图 2 p38MAPK 干扰序列测序结果图

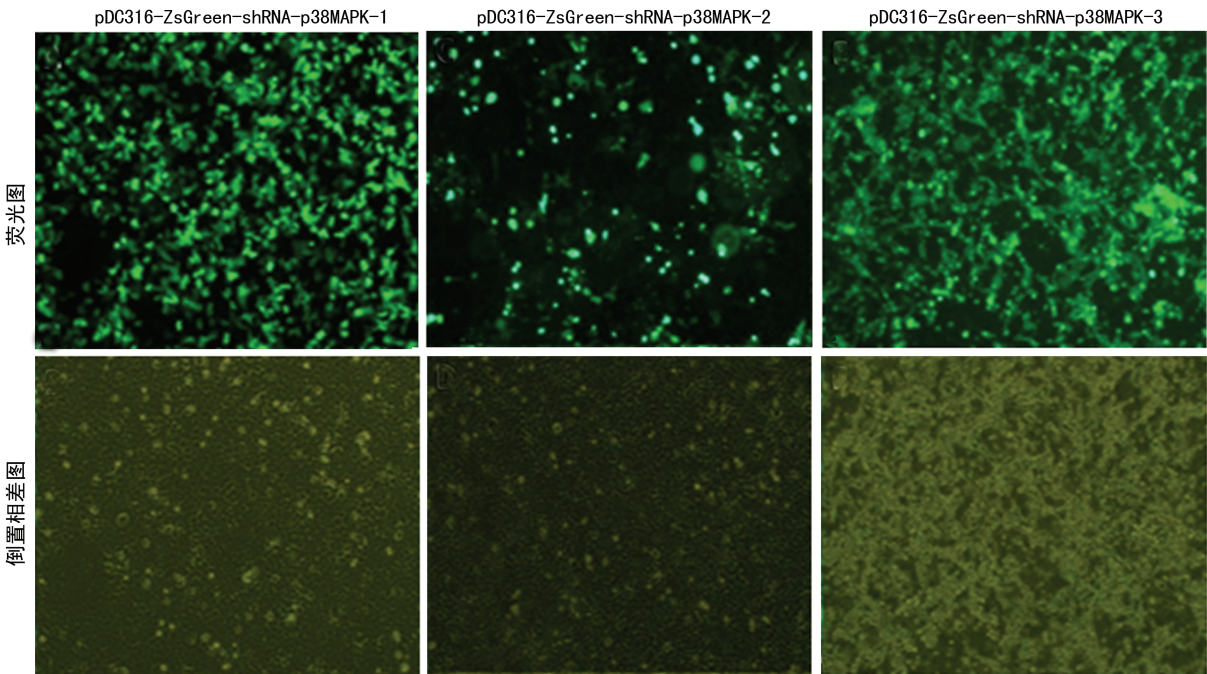


图 3 pDC316-ZsGreen-shRNA-p38MAPK 转染后 293T 细胞出现细胞病理效应 ($\times 200$)

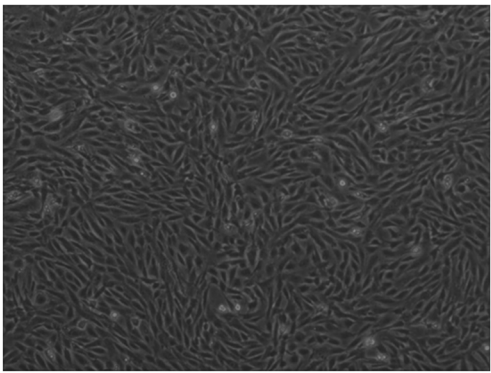
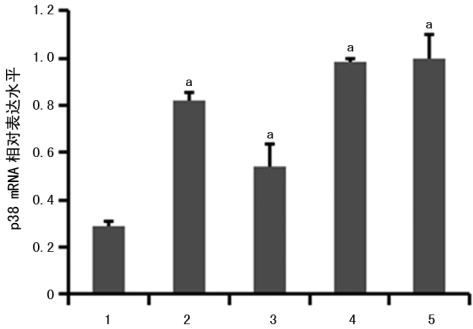


图 4 培养的兔上唇成纤维细胞(×400)



1: AD-shRNA-p38MAPK-1 组; 2: AD-shRNA-p38MAPK-2 组; 3: AD-shRNA-p38MAPK-3 组; 4: pDC316-ZsGreen-shRNA-scramble 组; 5: 空白对照组; ^a: $P < 0.05$, 与 AD-shRNA-p38MAPK 比较

图 5 p38MAPK 腺病毒转染后的各组细胞 mRNA 相对表达水平

3 讨 论

伤口的愈合分为两种:一种是由与受损伤部位特性相同的细胞修复即完全性修复,常见于表浅伤口的正常愈合及胎儿伤口无瘢痕愈合;另一种是几乎所有伤口愈合的结局,即上皮化的同时瘢痕形成。伤口收缩是加速伤口愈合的关键环节,但是过度的收缩则会导致伤口挛缩的发生,严重影响机体的功能和美观。但目前尚未发现可以抑制瘢痕形成的方法。

MAPKs 是细胞内的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。MAPKs 信号转导通路存在于大多数细胞内, p38MAPK 是其一个亚家族,是 MAPK 信号传导通路一种经典途径^[1-2]。其参与调控细胞生长、发育、分裂,并在伤口愈合中发挥作用。有研究表明,瘢痕成纤维细胞的分化依赖于 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、转化生长因子 β 1(TGF- β 1)及机械力的参与^[3]。陈伟等^[4]研究发现 MKK3、MKK6 和 p38MAPK 基因表达在早期妊娠胎儿的皮肤组织中表达较强。随着胎龄的增加,其表达逐渐减弱,其基因表达的变化与伤口愈合形成瘢痕的过程相一致。从而发现 MKK3、MKK6 和 p38MAPK 基因高表达可能是早期妊娠胎儿皮肤伤口无瘢痕愈合的原因。杜启翠等^[5]的研究表明, p38MAPK 阻断剂可以减少成纤维细胞向肌成纤维细胞分化,减少 α -SMA 和 TGF- β 1 的表达,从而可以防止皮肤瘢痕的形成。这些研究均表明在伤口的愈合中 p38MAPK 信号通路可能起着举足轻重的

作用,同时其之间的关系还有待进一步的研究。

基因治疗是指将外源正常基因导入受体细胞,以纠正或补偿基因缺陷和异常引起的疾病,以达到治疗疾病的目的,可基因治疗最初被认为只是一种治疗先天性代谢功能缺陷或晚期恶性肿瘤患者的方式^[6]。基因可通过体内或体外的方法进行转导。载体的选择对于基因的转导十分关键^[7-9]。目前,基因治疗中基因转导方式有两种,分别是病毒基因转导和非病毒基因转导。病毒的基因转染的效率明显偏高。病毒介导基因转染的创伤基因治疗的理想模型具有高效性、自限性、靶向性、少或无毒副作用及特异性。腺病毒、反转录病毒、慢病毒为最常用的病毒载体。腺病毒是目前瞬时基因转导最有效的载体,因其广泛的细胞趋向性,可以作为不同组织的良好指示剂。反转录病毒载体具有能够整合入宿主细胞基因组的优点,因此具有实现缺陷基因的终生校正的潜力。使用反转录病毒载体的主要缺点是转导效率低,因为载体需要转染分裂细胞,并且在体内不稳定^[10]。研究已表明皮肤细胞转染效率高达 95%,皮肤转染模型安全性较高。因此,人类腺病毒是基因治疗中最常见的病毒载体。STITELMAN 等^[11]的研究表明,腺病毒介导的血小板源性生长因子 β (PDGF- β)的基因转移克服了伤口愈合中的缺血缺陷,并对于治疗慢性非愈合性伤口提供了希望,其病毒的衣壳蛋白作用可能是腺病毒引起急性炎症性反应的原因。皮肤是腺病毒介导的基因治疗的理想靶器官^[12-13]。ARAGONA 等^[14]的研究表明,在小鼠皮肤上腺病毒介导的转染基因可高效表达。免疫反应导致的炎症是腺病毒载体转导中对伤口愈合最大的影响,而 SYLVESTER 等^[15]的文献表明,尽管腺病毒转导后的小鼠模型皮肤伤口出可能引发急性炎症性反应,但并未最终影响受伤皮肤的愈合能力。

成纤维细胞是皮肤疏松结缔组织中的重要细胞,也是瘢痕形成过程中的重要细胞。瘢痕是在伤口愈合过程中,肌成纤维细胞形成,从而使创口收缩而形成的。现在已有成熟的成纤维细胞和角质形成细胞的细胞培养技术,基因检测技术更加成熟^[16]。

本实验取新西兰白兔上唇皮肤,成功培养出成纤维细胞,将构建的病毒载体可以成功转染到皮肤成纤维细胞中,并运用此细胞筛选出沉默效率最高的一个腺病毒载体,为其能在活体局部注射后取得良好的沉默效果奠定了基础。

参考文献

[1] HU M L,ZHOU F Y,LIU J J,et al. Electroacupuncture inhibits the activation of p38MAPK in the central descending facilitatory pathway in rats with inflammatory pain[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2017 (2017):7531060.

- [2] GAESTEL M. MAPK-activated protein kinases (MKs); novel insights and challenges[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2016(3): 88.
- [3] SARRAZY V, KOEHLER A, CHOW M L, et al. Integrins $\alpha\text{v}\beta 5$ and $\alpha\text{v}\beta 3$ promote latent TGF- $\beta 1$ activation by human cardiac fibroblast contraction[J]. *Cardiovasc Res*, 2014, 102(3): 407-417.
- [4] 陈伟, 付小兵, 葛世丽, 等. 胎儿和出生后机体皮肤内 p38MAPK 及 MAPKKs 基因表达变化的比较性研究[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2005, 19(4): 291-295.
- [5] 杜启翠, 肖文林, 薛令法, 等. p38 丝裂原活化蛋白激酶在周期性牵张力诱导人增生性瘢痕成纤维细胞向肌成纤维细胞分化中的作用[J]. *中华口腔医学杂志*, 2013, 48(10): 615-620.
- [6] BISWAS M, KUMAR S R P, TERHORST C, et al. Gene therapy with regulatory T cells: a beneficial alliance[J]. *Front Immunol*, 2018(9): 554.
- [7] LOUKOGEORGAKIS S P, FLAKE A W. In utero stem cell and gene therapy: current status and future perspectives[J]. *J Pediatr Surg*, 2014, 24(3): 237-245.
- [8] DITTO A J, REHO J J, SHAH K N, et al. In vivo gene delivery with L-tyrosine polyphosphate nanoparticles[J]. *Mol Pharm*, 2013, 10(5): 1836-1844.
- [9] JOYEUX L, DANZER E, LIMBERIS M P, et al. In utero lung gene transfer using adeno-associated viral and lentiviral vectors in mice [J]. *Hum Gene Ther Methods*, 2014, 25(3): 197-205.
- [10] STITELMAN D H, BRAZELTON T, BORA A, et al. Developmental stage determines efficiency of gene transfer to muscle satellite cells by in utero delivery of adeno-associated virus vector serotype 2/9[J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2014(1): 14040.
- [11] STITELMAN D H, BRAZELTON T R, ENDO M, et al. Life-long transgene expression in skeletal muscle without transduction of satellite cells following embryonic myogenic progenitor transduction by lentivirus administered in utero[J]. *Stem Cells Dev*, 2015, 24(16): 1878-1887.
- [12] ZHOU D Z, GAO Y S, AIED A, et al. Highly branched poly(β -amino ester)s for skin gene therapy [J]. *J Control Release*, 2016, 244(Pt B): 336-346.
- [13] GAUGLITZ G G, JESCHKE M G. Combined gene and stem cell therapy for cutaneous wound healing[J]. *Mol Pharm*, 2011, 8(5): 1471-1479.
- [14] ARAGONA M, BLANPAIN C. Gene therapy: Transgenic stem cells replace skin[J]. *Nature*, 2017, 551(7680): 306-307.
- [15] SYLVESTER K G, NESBIT M, RADU A, et al. Adenoviral-mediated gene transfer in wound healing: acute inflammatory response in human skin in the SCID mouse model[J]. *Wound Repair Regen*, 2000, 8(1): 36-44.
- [16] HIRSCH T, ROTHOEFT T, TEIG N, et al. Regeneration of the entire human epidermis using transgenic stem cells [J]. *Nature*, 2017, 551(7680): 327-332.

(收稿日期: 2018-09-20 修回日期: 2019-01-04)

(上接第 1466 页)

- circle amplification in combination with real-time PCR[J]. *Clin Chim Acta*, 2011, 412(21/22): 1905-1911.
- [8] REVILL P, LOCARNINI S. Antiviral strategies to eliminate hepatitis B virus covalently closed circular DNA (cccDNA) [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2016, 30(10): 144-150.
- [9] SHI X, WANG X, XU X, et al. Impact of HBV replication in peripheral blood mononuclear cell on HBV intrauterine transmission[J]. *Front Med*, 2017, 11(4): 548-553.
- [10] JOURDAIN G, NGO-GIANG-HUONG N, HARRISON L, et al. Tenofovir versus placebo to prevent perinatal transmission of hepatitis B[J]. *N Engl J Med*, 2018, 378(10): 911-923.
- [11] GAO S, DUAN Z P, CHEN Y, et al. Compartmental HBV evolution and replication in liver and extrahepatic sites after nucleos(t)ide analogue therapy in chronic hepatitis B carriers[J]. *J Clin Virol*, 2017, 94(1): 8-14.
- [12] RYBICKA M, WOZIWODZKA A, ROMANOWSKI T, et al. Differences in sequences between HBV-relaxed circular DNA and covalently closed circular DNA[J]. *Emerg Microbes Infect*, 2017, 6(6): e55-62.
- [13] MA J, WU L, LI Z, et al. Versatile Electrochemiluminescence assays for PEDV antibody based on rolling circle amplification and Ru-DNA nanotags [J]. *Anal Chem*, 2018, 90(12): 7415-7421.
- [14] LUCIFORA J, BONNIN M, AILLOT L, et al. Direct antiviral properties of TLR ligands against HBV replication in immune-competent hepatocytes [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 5390-5398.
- [15] LIU Y, ZHAO M, GONG M, et al. Inhibition of hepatitis B virus replication via HBV DNA cleavage by Cas9 from *Staphylococcus aureus* [J]. *Antiviral Res*, 2018, 152(1): 58-67.
- [16] GAO Y, LI Y, MENG Q, et al. Serum hepatitis B virus DNA, RNA, and HBsAg; which correlated better with intrahepatic covalently closed circular DNA before and after nucleos(t)ide analogue treatment? [J]. *J Clin Microbiol*, 2017, 55(10): 2972-2982.
- [17] WEI Z Q, ZHANG Y H, KE C Z, et al. Curcumin inhibits hepatitis B virus infection by down-regulating cccDNA-bound histone acetylation [J]. *World J Gastroenterol*, 2017, 23(34): 6252-6260.

(收稿日期: 2018-08-02 修回日期: 2018-12-10)