

文章编号: 1004-0374(2010)03-0296-06

## HIV-1 载体的研发沿革

张帆<sup>1,2</sup>, 张敬之<sup>1,2\*</sup>

(1 上海交通大学医学遗传研究所, 上海 200040; 2 上海交通大学附属儿童医院, 上海 200040)

**摘要** 自从科学家于1983年发现了人类免疫性缺陷病毒1 (human immunodeficiency virus 1, HIV-1)以来, 随着对它的研究不断深入, 其表达载体的开发也有了长足的进步。与其他逆转录病毒载体相比, 如莫罗尼小鼠白血病病毒 (murine leukemia virus, MLV) 载体和泡沫病毒 (foamy virus, FV) 载体等, HIV-1 载体具有诸多独特的优点, 因而有着更广泛的应用于临床基因治疗的前景。该文对 HIV-1 载体的研发过程及其优缺点进行综述。

**关键词:** 人类免疫性缺陷病毒 1; 慢病毒载体; HIV-1 载体; SIN 载体  
**中图分类号:** R373; R730.54 **文献标识码:** A

## The advances of HIV-1 vector research

ZHANG Fan<sup>1,2</sup>, ZHANG Jing-zhi<sup>1,2\*</sup>

(1 Shanghai Institute of Medical Genetics, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200040, China;

2 Shanghai Children's Hospital affiliated to Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200040, China)

**Abstract:** Since the first discovery of human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) in 1983, scientists have gained a lot of insights on HIV-1. At the meantime, the research on its vector has been made quite big achievements. In contrast to other retroviral vectors, such as murine leukemia virus (MLV) vector, or foamy virus (FV) vector, HIV-1 vector holds a few unique advantages, which is more suitable for the usage in gene therapy. In this review, the research advances in HIV-1 vector with its features have been extensively discussed.

**Key words:** human immunodeficiency virus 1; lentiviral vector; HIV-1 vector; SIN vector

早在 20 世纪 80 年代, Yee 等<sup>[1]</sup>通过对逆转录病毒——莫罗尼小鼠白血病病毒 (murine leukemia virus, MLV) 的功能性删减和拆分, 使之只能一次性感感染宿主细胞并将外源基因稳定整合入染色体。随后该病毒载体又被应用于基因治疗中<sup>[2]</sup>。所谓基因治疗, 即是通过外源基因的导入来代偿或修复原已缺失的功能。而此构建病毒载体的基本理念又被应用到以后慢病毒载体的研发过程中。

慢病毒载体是在慢病毒基础上通过基因删改而构建的载体。慢病毒载体保留了逆转录病毒的感染和整合的能力, 可携带约 8 kb 的外源基因。它既能有效地感染分裂细胞, 又能感染非分裂细胞, 并在靶细胞内稳定地整合与表达。因此, 相较于只能感染分裂细胞的其他逆转录病毒载体, 如 MLV, 慢

病毒载体更具有被应用于基因治疗的前景。在各种类型的慢病毒载体中, 以人类免疫性缺陷病毒 1 (human immunodeficiency virus 1, HIV-1) 为骨架的载体的研究最为深入 (图 1)。HIV-1 除了包含 3 个逆转录病毒共有的基因 *gag*、*pol*、*env* 之外, 还具备 6 个特有的辅助基因 *tat*、*rev*、*vif*、*vpu*、*vpr*、*nef*。其中, *gag* 编码病毒的结构蛋白 (包含 MA、CA、NC); *pol* 编码蛋白酶、逆转录酶、RNA 酶 H 和整

收稿日期: 2009-08-28; 修回日期: 2009-09-23

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (“863” 项目)  
(2007AA021206)

\*通讯作者: Tel: 021-62472308; E-mail: jzhang38@hotmail.com

合酶; *env* 则负责编码病毒的膜糖蛋白<sup>[3,4]</sup>。HIV-1 病毒颗粒所包含的 MA 和 VPR 蛋白能与逆转录后的 DNA 形成复合体并主动穿过核孔, 因此它具有感染非分裂细胞的能力<sup>[5]</sup>。

HIV-1 的基因组是由约 9.7 kb 的 RNA 链所组成。该 RNA 链通过原病毒(provirus) 5' LTR (long

terminal repeat) 上的 U3 启动子转录生成, 最终两条未被剪接的完整的 RNA 链被包装到病毒外壳蛋白中, 经成熟后形成具有感染力的活病毒(图 2)。在此过程中, 部分 RNA 链在宿主体内又同时被多种方式剪接, 生成 30 多种转录本, 来帮助完成病毒这一包装过程<sup>[6]</sup>。

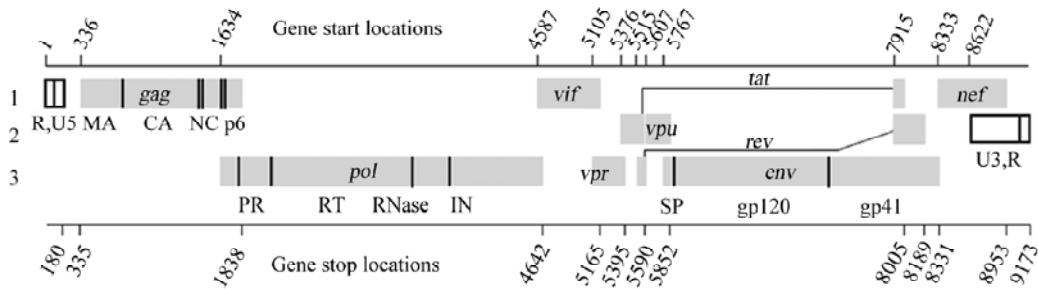


图1 HIV-1结构图解<sup>[3]</sup>

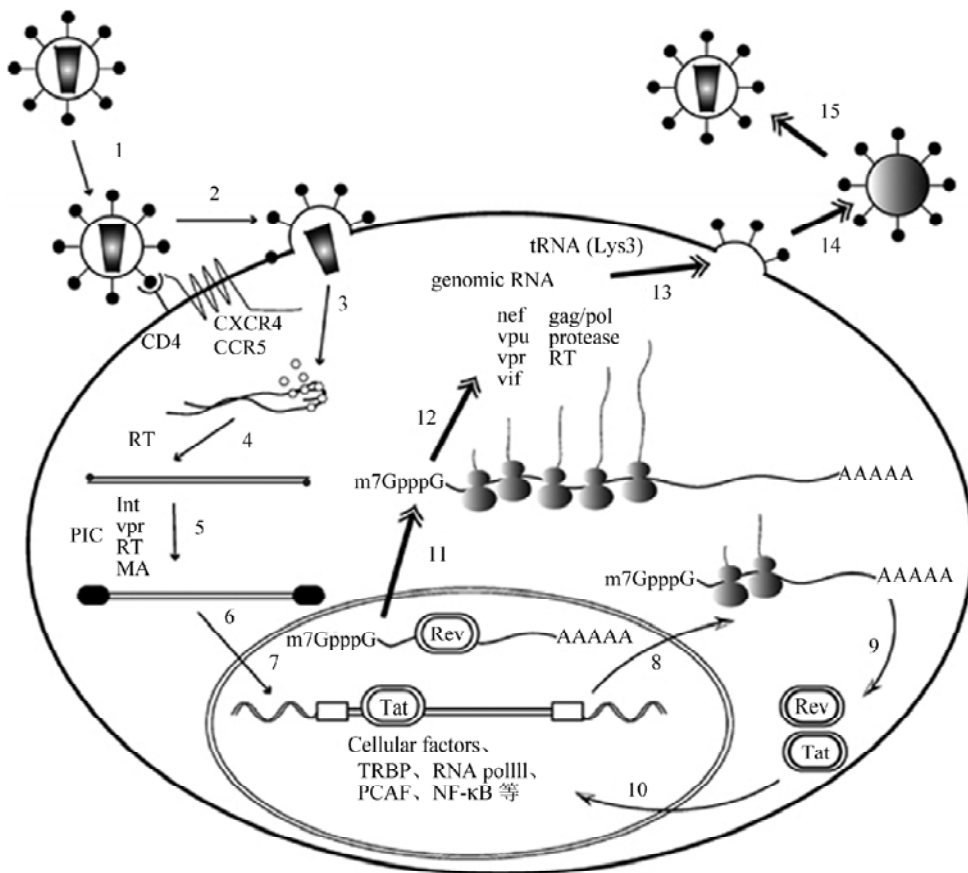


图2 HIV-1生活周期<sup>[7]</sup>

1: HIV 病毒吸附至靶细胞; 2: HIV 病毒与靶细胞融合; 3: 病毒的双链 RNA 游离至胞浆中; 4: 病毒 RNA 进行逆转录; 5: 生成整合前病毒 DNA; 6: 前病毒 DNA 进入细胞核; 7: 前病毒 DNA 整合进宿主基因; 8: 转录生成 mRNA; 9: 翻译生成早期病毒的调节蛋白 Tat、Rev; 10: Tat、Rev 进入细胞核, Tat 促进病毒 mRNA 的转录; 11: Rev 帮助单剪切及未剪切 mRNA 出核; 12: 翻译生成病毒结构蛋白; 13: 生成病毒的各种蛋白、RNA 等, 在胞膜处聚集; 14: 生成病毒并出细胞; 15: 病毒成熟

## 1 HIV-1 载体的发展

### 1.1 HIV-1 载体的雏形

为了更安全地研究 HIV-1 病毒生理特点, Lu 等<sup>[8]</sup>将 HIV-1 基因组功能性地分割成几个片段, 通过几个质粒共转染细胞, 来模拟 HIV-1 的形成过程。以此作为起点, 研究人员将 HIV-1 病毒编码蛋白的序列分别克隆到几个表达载体中, 而保留维持 HIV-1 最低生理要求的骨架, 如 LTR 和包装信号等, 使之具有更多的空间用于外源基因的导入。载体经共转染入细胞后培养, 在培养液上清中即获得只有一次感染能力的假病毒。

### 1.2 三质粒系统

早在 1997 年前后, 在 Trono 和 Verma 的指导下, Naldini 等<sup>[5]</sup>和 Kafri 等<sup>[9]</sup>应用了三质粒系统构建了 HIV-1 载体, 具体包括包装质粒(packaging construct)、包膜质粒(envelope plasmid)以及病毒转移载体(transfer vector)(图3)。其中, 包装质粒编码和表达部分 HIV-1 功能蛋白, 如 *gag/pol*、*tat*、*rev* 等基因; 包膜质粒编码水泡口炎病毒 G 包膜糖蛋白(vesicular stomatitis virus G, VSV-G)的基因, 由于 HIV-1 包膜糖蛋白只能感染 CD4<sup>+</sup>T 细胞和巨噬细胞等, 而 VSV-G 包膜糖蛋白不需与特定受体蛋白结合就能感染宿主细胞, 因此 VSV-G 的替换能增加假病毒感染的广谱性<sup>[10]</sup>; 转移载体仅保留 HIV-1 的基本骨架, 余下空间用于目的基因的导入。这三种质粒共转染宿主细胞, 即能获得我们所需的假病毒。

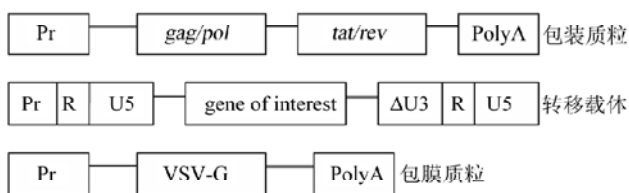


图3 三质粒基本系统

在此基础上, Trono 研究组将包装质粒中的一些 HIV-1 非必需辅助基因进一步删除, 如 *vif*、*vpr*、*vpu*、*nef*, 有助于降低病毒载体的毒性以及同源重组的概率<sup>[11]</sup>。但缺失 Vpr 蛋白的包装质粒不易转染巨噬细胞<sup>[3]</sup>。尽管转移载体上依赖 TAT 的 5' LTR 的 U3 序列已被 CMV 启动子所取代, *tat* 基因的敲除仍会降低包装细胞所产生的假病毒的滴度<sup>[12, 13]</sup>。因此, *tat* 基因一般由另一质粒表达, 而不是被删除。同时, 在转移载体中导入 cPPT (central polyurine

tract) 及 WPRE (woodchuck hepatitis post-transcriptional regulatory element) 可更有效地提高载体的逆转录和表达效率<sup>[8]</sup>。其中, cPPT 位于 HIV-1 整合酶基因部位, 是正链 DNA 的延伸起始位点之一<sup>[10, 14]</sup>, 它能使 HIV-1 RNA 在靶细胞中更有效地生成双链 DNA<sup>[15]</sup>, 从而增加假病毒的滴度。

这类载体一般被视为第二代慢病毒载体。它的优点是能够生成仅具一次感染能力的假病毒, 从本质上改善了载体的安全性。但是, 包装质粒与转移载体间因同源序列而造成的同源重组, 有可能生成重组适应性病毒(recombinant competent virus, RCV)。因此, 出于生物安全性的考虑, 这种 HIV-1 载体离临床应用还有一段距离。

### 1.3 SIN 载体

当病毒在宿主细胞中逆转录生成 cDNA 时, 其 3' 端 U3 区有一个跃迁至 5' 端的过程。而作为启动子, 3' 端 U3 区富含多种转录因子结合位点, 如 NF- $\kappa$ B、SP1、AP-1、TATA box 等<sup>[16]</sup>。自身失活(self-inactivating, SIN)型 HIV-1 载体, 即是在上述 HIV-1 载体的 U3 区下游段内, 删除一段富含转录因子结合位点的序列(此时 U3 区为  $\Delta$ U3)后所形成的转移载体, 其自身启动子失活<sup>[17]</sup>。HIV-1 载体经自我删减后, 大大减少了被整合入病毒骨架的转录产物, 但是, 它仍具备少量基础转录(basal transcription)活性。一般 SIN 载体被认为是第三代慢病毒载体。

### 1.4 嵌合型 LTR

将其他家系的逆转录病毒的 U3 5' 端与 HIV-1  $\Delta$ U3 的 5' 端进行置换, 即形成嵌合型 LTR。呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)的增强子则经常被使用, 从而进一步减少同源重组并形成 RCV 的可能性<sup>[9]</sup>。

### 1.5 多质粒系统

多质粒系统, 即是在原有三质粒系统上(图3), 保留 SIN 转移载体和 VSV-G 包膜载体, 对包装质粒进行功能性再分割: (1) 四质粒系统: 包装质粒一分为二, *gag/pol* 和 *rev* (*tat* 从原质粒中去除, *rev* 被分离到另一表达载体)<sup>[9]</sup>; (2) 五质粒系统: 包装质粒一分为三, *gag/pol*、*rev* 和 *tat*<sup>[18]</sup>; (3) 六质粒系统: 包装质粒一分为四, *gag-pol* 由两个质粒携带, 即 *gag-pr*、*vpr-rt/in-vif*、*rev* 和 *tat* (其中 *pr* 为编码蛋白酶的基因, *rt* 为编码逆转录酶 H 的基因, *in* 为编码整合酶的基因)<sup>[18]</sup>; (4) 七质粒系统: 包装质粒一分为五, 主要改变在于 *gag-pol* 由三个

质粒携带, *gag*、*vpr-pr*、*vpr-rt/in-vif*再加上 *rev* 和 *tat* 两个质粒<sup>[17]</sup>。至此, 质粒间的同源重组几乎不可能发生。

然而, 载体的共转染效率随着使用质粒数的增加而递减, 但包装细胞系(packaging cell line)可将相关病毒基因分别整合入宿主染色体, 通过表达包装病毒的相关蛋白来克服此缺点。不过 VSV-G 对细胞有毒性, 如制成包装细胞系则需使用诱导性启动子<sup>[19, 20]</sup>。

## 2 通读问题的提出及解决方法

SIN 在提高载体的安全性的同时, 也带来了另一个问题。因为位于 3' LTR 的 R 是 PolyA 信号区(AAUAAA), 转录本在此终止转录, 而构建 SIN 载体所删除的 U3 区启动子序列中包含了增强 Poly A 终止转录作用的元件(upstream sequence elements, USE)<sup>[21]</sup>。因此, 该删除导致 PolyA 的转录终止能力急剧下降, 从而增加了载体整合后转录其下游基因的可能性(通读率)。如果下游原沉默基因或原癌基因的转录被激活, 则极有可能造成癌变<sup>[22]</sup>。有研究表明, SIN 载体的转录通读率高达 50%, 远高于未经删减的 HIV-1 载体(约 5%)<sup>[23]</sup>。

### 2.1 $\Delta$ U3 区插入 USE 序列

在 SIN 载体的  $\Delta$ U3 区插入其他基因的 USE 序列, 有可能有效抑制通读。Schambach 等<sup>[21]</sup>在  $\Delta$ U3 处插入 SV40 的 USE 两倍体(2 $\times$ SV40 USE, 约 100 bp)序列, 结果发现改造后的载体的通读率降低到 3%, 同时滴度及转基因的表达也有明显改善, 滴度提高 2.8 倍, 基因表达率则提高 2 倍左右。

### 2.2 $\Delta$ U3 区插入隔离子

隔离子是染色体上能够保护基因免受其外部增强子和非活性染色质结构影响的 DNA 序列<sup>[24, 25]</sup>。隔离子 cHS4 (hypersensitive site 4 of the chicken  $\beta$ -globin) 是一条长 1.2 kb 的 DNA 片段, 其核心区域为 0.25 kb, 内含 CTCF 片段<sup>[26]</sup>。在  $\Delta$ U3 中插入 cHS4 后, 具有两大优势: (1) 由于 CTCF 调控的增强子阻断效应, 减弱了载体中外源基因在此位点的转录活性, 从而降低通读率<sup>[26, 27]</sup>; (2) 整合位点位置效应的减弱。载体的旁侧序列对基因表达有着重大影响, cHS4 隔离子的插入, 可减少转基因沉默或在子代细胞内出现非正常表达的现象<sup>[25, 26, 28]</sup>。

Hanawa 等<sup>[27]</sup>的进一步研究表明, 反向插入 cHS4, 其通读率比正向插入更低。反向插入 0.25 kb 的核心区域片段后, 在转基因的表达率提高的同

时, 其通读率可减少至大约 3%。

## 3 HIV-1 载体的衍生体

HIV-1 载体上添加一些调控序列后, 可使载体具有特征性, 以满足各研究的具体需求。

整合缺陷型 HIV-1 载体(IDLV): 将整合酶第 64 位天冬氨酸突变为缬氨酸使之活性丧失。因此, 载体只能以游离于染色体外的形式表达, 从而排除了位置效应和插入性突变的可能性<sup>[29]</sup>。

将四环素诱导系统引入 HIV-1 载体内, 使之可诱导性地表达<sup>[19, 20]</sup>, 或在载体内添加能表达 FKBP 突变体蛋白(degradation domain, DD)的基因与目的基因(protein of interest, POI)融合后形成的融合蛋白, 在未诱导条件下被降解, 而当在培养基中加入诱导剂 Shield1 后, 则能稳定表达<sup>[30]</sup>。

载体也可以携带发夹结构的小 RNA (miRNA) 及其启动子, 致使靶基因沉默, 从而研究该基因的功能<sup>[31]</sup>。

## 4 HIV-1 载体的应用

在体外, HIV-1 载体常被用于稳定转导那些原先较难被转染的细胞, 如用于体外诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPS)等<sup>[32]</sup>。早在十多年前, Verma 就曾将 HIV-1 载体转入患有视网膜退化的小鼠眼内, 说明 HIV-1 载体能够有效地感染静息细胞, 并在其中稳定地表达<sup>[33]</sup>。我们研究所也用 HIV-1 假病毒感染受精卵, 从而获得了转基因小鼠, 并成功地对  $\beta$  地中海贫血模型小鼠进行了治疗<sup>[34-36]</sup>。Nanou 和 Azzouz<sup>[37]</sup>报道 HIV-1 载体能够有效地感染模型鼠的静息神经细胞, 从而在脊髓性肌萎缩症(spinal muscular atrophy)、帕金森病(Parkinson's disease)等疾病的治疗中能够较好地提供相关地效用蛋白。

临床上, 通过 HIV-1 载体介导, 能对某些免疫系统性疾病, 如 X 染色体连锁的严重联合免疫缺陷性疾病(X-severe combined immunodeficiency, X-CID)等的基因治疗取得了较好的效果<sup>[38]</sup>。Levine 等<sup>[39]</sup>将表达 HIV-1 *env* 的反义 RNA 的条件复制性假病毒导入 HIV 患者体内后, 致使其艾滋病毒量(viral load)大大减少, 并且未发现插入性突变的发生, 这种较为稳定的基因治疗方法为 HIV 的完全治愈带来新的希望。

但是, 总体来说, 出于安全性的考量, HIV-1 载体一般应用于体外转染以及一些致死率较高的疾

病，如艾滋病、癌症等。

### 5 小结

HIV-1 载体发展至今，从十余年前的三质粒系统到现今的多质粒系统，载体的安全性有明显的提

高，形成重组性活性病毒的可能性几乎为零。与 MLV 和 FV 载体相反，HIV-1 载体均匀地散落于染色体中，具有不少优点(表 1)，是个很有应用前景的载体。相信随着载体发展的日趋成熟，HIV-1 载体将会被更广泛地应用于疾病的基因治疗。

表 1 HIV-1 载体与 MLV 载体的比较

载体类型	可感染的宿主细胞	整合位点	通读率
HIV-1 载体	静息和分裂细胞	均匀散落 <sup>[40]</sup>	U3 删减前或 ΔU3 改造后低 (约 5%) <sup>[23, 27]</sup>
MLV 载体	分裂细胞	倾向于 5' UTR <sup>[41]</sup>	高(约 35%) <sup>[23, 42]</sup>
FV 载体	以分裂细胞为主，静息细胞为辅 <sup>[43]</sup>	倾向于 5' UTR 及 CpG 岛 <sup>[44]</sup>	

ÖÂÐ»£ÖÖDÄ,ÐÐ»ÖðÖçİİÖ°Ê¿;çÊİÖ×Èè½İÉÚ°İİ  
;Ç¿İ-ÑŞİİÖ±¾ÄµÄÖ,µ¼;£

### [参 考 文 献]

[1] Yee JK, Moores J, Jolly D, et al. Gene expression from transcriptionally disabled retroviral vectors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84 (15): 5197-201

[2] Fink JK, Correll PH, Perry LK, et al. Correction of glucocerebrosidase deficiency after retroviral-mediated gene transfer into hematopoietic progenitor cells from patients with Gaucher disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87 (6): 2334-8

[3] Watts J, Dang K, Gorelick R, et al. Architecture and secondary structure of an entire HIV-1 RNA genome. *Nature*, 2009, 460 (7256): 711-9

[4] Buchsacher GJ, Staal FW. Development of lentiviral vectors for gene therapy for human diseases. *Blood*, 2000, 95 (8): 2499-504

[5] Naldini L, Blomer U, Gallay P, et al. *In vivo* gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*, 1996, 272 (5259): 263-7

[6] Bohne J, Wodrich H, Krausslich H, et al. Splicing of human immunodeficiency virus RNA is position-dependent suggesting sequential removal of introns from the 5' end. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33 (3): 825-37

[7] Scherer L, Rossi JJ, Weinberg MS. Progress and prospects: RNA-based therapies for treatment of HIV infection. *Gene Ther*, 2007, 14 (14): 1057-64

[8] Lu YC, Touzjian N, Stenzel M, et al. Identification of cis-acting repressive sequences within the negative regulatory element of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, 1990, 64 (10): 5226-9

[9] Kafri T, Blomer U, Peterson DA, et al. Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors. *Nat Gene*, 1997, 17: 314-7

[10] Quinonez R, Sutton RE. Lentiviral vectors for gene delivery into cells. *DNA Cell Biol*, 2002, 21 (12): 937-51

[11] Zufferey R, Nagy D, Mandel RJ, et al. Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery *in vivo*. *Nat Biotechnol*, 1997, 15 (9): 871-5

[12] Dull T, Zufferey R, Kelly M, et al. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol*, 1998, 72 (11): 8463-71

[13] Delenda C. Lentiviral vectors: optimization of packaging, transduction and gene expression. *J Gene Med*, 2004, 6 (1): 125-38

[14] De Rijck J, Van Maele B, Debyser Z. Positional effects of the central DNA flap in HIV-1-derived lentiviral vectors. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 328 (4): 987-94

[15] Sirven A, Pflumio F, Zennou V, et al. The human immunodeficiency virus type-1 central DNA flap is a crucial determinant for lentiviral vector nuclear import and gene transduction of human hematopoietic stem cells. *Blood*, 2000, 96 (13): 4103-10

[16] Zufferey R, Dull T, Mandel RJ, et al. Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient *in vivo* gene delivery. *J Virol*, 1998, 72 (12): 9873-80

[17] Miyoshi H, Blomer U, Takahashi M, et al. Development of a self-inactivating lentivirus vector. *J Virol*, 1998, 72 (10): 8150-7

[18] Westerman KA, Ao Z, Cohen EA, et al. Design of a trans protease lentiviral packaging system that produces high titer virus. *Retrovirology*, 2007, 4: 96

[19] Kafri T, Van Praag H, Ouyang L, et al. A packaging cell line for lentivirus vectors. *J Virol*, 1999, 73 (1): 576-84

[20] Ory DS, Neugeboren BA, Mulligan RC, et al. A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotypes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93 (21): 11400-6

[21] Schambach A, Galla M, Maetzig T, et al. Improving transcriptional termination of self-inactivating retroviral and lentiviral vectors. *Mol Ther*, 2007, 15 (6): 1167-73

[22] Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, et al. LM02-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*, 2003, 302 (5644): 415-9

[23] Yang Q, Lucas A, Son S, et al. Overlapping enhancer/promoter and transcriptional termination signals in the lentiviral long terminal repeat. *Retrovirology*, 2007, 4: 4

[24] West AG, Gaszner M, Felsenfeld G. Insulator: many functions, many mechanisms. *Genes Dev*, 2002, 16 (3): 271-88

- [25] Evans-Galea M, Wielgosz M, Hanawa H, et al. Suppression of clonal dominance in cultured human lymphoid cells by addition of the cHS4 insulator to a lentiviral vector. *Mol Ther*, 2007, 15(4): 801-9
- [26] Recillas-Targa F, Pikaart MJ, Burgess-Beusse B, et al. Position-effect protection and enhancer blocking by the chicken  $\beta$ -globin insulator are separable activities. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(10): 6883-8
- [27] Hanawa H, Yamamoto M, Zhao H, et al. Optimized lentiviral vector design improves titer and transgene expression of vectors containing the chicken  $\beta$ -globin locus HS4 insulator. *Mol Ther*, 2009, 17(4): 667-74
- [28] Ryu BY, Evans-Galea M, Gray JT, et al. An experimental system for the evaluation of retroviral vector design to diminish the risk for proto-oncogene activation. *Blood*, 2008, 111(4): 1866-75
- [29] Lombardo A, Genovese P, Beausejour CM, et al. Gene editing in human stem cells using zinc finger nucleases and integrase-defective lentiviral vector delivery. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(11): 1298-306
- [30] Banaszynski LA, Chen LC, Maynard-Smith LA, et al. A rapid, reversible, and tunable method to regulate protein function in living cells using synthetic small molecules. *Cell*, 2006, 126(5): 995-1004
- [31] Stewart SA, Dykxhoorn DM, Palliser D, et al. Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells. *RNA*, 2003, 9(4): 493-501
- [32] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006, 126(4): 663-76
- [33] Miyoshi H, Takahashi M, Gage FH, et al. Stable and efficient gene transfer into the retina using an HIV-based lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(19): 10319-23
- [34] Xie SY, Ren ZR, Zhang JZ, et al. Restoration of the balanced  $\alpha/\beta$ -globin gene expression in  $\beta$ 654-thalassemia mice using combined RNAi and antisense RNA approach. *Hum Mol Genet*, 2007, 16(21): 2616-25
- [35] Li W, Xie SY, Guo XB, et al. A novel transgenic mouse model produced from lentiviral germline integration for the study of  $\beta$ -thalassemia gene therapy. *Haematologica*, 2008, 93(3): 356-62
- [36] 张敬之, 郭歆冰, 谢书阳, 等. 用慢病毒载体介导产生绿色荧光蛋白(GFP)转基因小鼠. *自然科学进展*, 2006, 16(5): 571-7
- [37] Nanou A, Azzouz M. Gene therapy for neurodegenerative diseases based on lentiviral vectors. *Prog Brain Res*, 2009, 175: 187-200
- [38] Hu B, Yang H, Dai B, et al. Nonintegrating lentiviral vectors can effectively deliver ovalbumin antigen for induction of antitumor immunity. *Hum Gene Ther*, 2009, 20(12): 1652-64
- [39] Levine B, Humeau L, Boyer J, et al. Gene transfer in humans using a conditionally replicating lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(46): 17372-7
- [40] Schroder AR, Shinn P, Chen HM, et al. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell*, 2002, 110(4): 521-9
- [41] Wu XL, Li Y, Crise B, et al. Transcription start region in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science*, 2003, 300(5826): 1749-51
- [42] Zaiss A, Son S, Chang LJ, et al. RNA 3' read through of oncoretrovirus and lentivirus: implications for vector safety and efficacy. *J Virol*, 2002, 76(14): 7209-19
- [43] Russell DW, Miller AD. Foamy virus vectors. *J Virol*, 1996, 70(1): 217-22
- [44] Trobridge GD, Miller DG, Jacobs MA, et al. Foamy virus vector integration sites in normal human cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(5): 1498-503