

非病毒载体在基因治疗中的发展与应用

谌 平 何成宜 陈志英

(中国科学院深圳先进技术研究院 基因与细胞工程研究室 深圳 518055)

摘 要 构建基因载体并建立安全高效的基因载体体内投递系统是基因治疗的关键。基因载体分病毒与非病毒载体。病毒载体转染高效, 已应用于临床, 但仍面临安全性低的问题。非病毒载体制备简单、安全性高、潜力大; 然而, 转染效率低的问题限制了其临床应用。基因治疗领域的研究者一直致力于优化非病毒载体投递系统, 提高转染效率, 已经出现可应用于临床的基因投递产品。文章旨在回顾非病毒基因载体的研究进展及其临床应用前景。

关键词 基因投递; 非病毒载体; 基因治疗; 微环 DNA

中图分类号 Q 812 文献标志码 A

Advances of Non-Viral Delivery Systems Applied in Gene Therapy

CHEN Ping HE Chengyi CHEN Zhiying

(Laboratory for Gene and Cell Engineering, Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China)

Abstract Establishment of safe and effective gene vectors and in vivo delivery systems are crucial for gene therapy. The vectors for gene therapy comprise viral and non-viral vectors. Of which the viral vectors have been widely applied in clinical trials, due to their highly transduction efficiency; while they still encounter many potential safety concerns. In contrast, the non-viral vectors are safe and easy to prepare gene vehicles. However, the insufficient transfection efficiency limits their clinical application. Many efforts have been devoted into optimizing the delivery systems to enhance the gene transfer efficiency of non-viral vectors, a few of which are currently undergoing clinical trials. In this review, the recent advances of non-viral gene delivery systems and their clinical prospects were summarized.

Keywords gene delivery; non-viral vector; gene therapy; minicircle DNA

1 引 言

基因治疗是将携带目的基因的基因载体导

入患者体内, 表达目的基因产物, 从而达到治疗疾病的目的。构建基因载体及发展安全高效的体内基因载体投递系统是基因治疗的两个关键^[1]。基因载体根据其来源的不同, 可分为病

收稿日期: 2016-10-17 修回日期: 2017-02-09

基金项目: 深圳市政府基金(SFG 2012.566、SKC 2012.237)

作者简介: 谌平, 博士, 研究方向为 HBV 免疫治疗; 何成宜, 高级工程师, 研究方向为基因与细胞治疗技术; 陈志英(通讯作者), 研究员, 研究方向为基因-免疫治疗, E-mail: zy.chen1@siat.ac.cn。

毒载体和非病毒载体两大类。病毒载体如腺病毒(adenovirus)、腺病毒相关病毒(Adeno-Associated Virus, AAV)、慢病毒(lentivirus)等都被改造用来携带治疗性基因,称为病毒载体。它们具有与野生病毒同样的感染细胞的能力,因此转染效率很高。非病毒载体如标准质粒和微环 DNA 等,只含治疗性基因成分和其他 DNA 序列,必须靠物理转染技术如电转、高压或化学制剂如脂质体、纳米等技术送达靶细胞。尽管病毒载体转染高效,但仍存在基因容量小、毒副作用大、制备成本高等难以克服的缺陷。病毒载体所能携带的目的基因往往受限于野生型病毒的基因组大小,如目前公认最安全高效的 AAV 载体,其能容纳的目的基因(包括基因调控序列:启动子、增强子、加尾信号 poly A 等元件)大小限制在 3.5 kb 以内^[2]。更严重的是安全性问题,病毒载体的病毒蛋白可引起机体强烈的免疫反应,甚至可能致命;而且所携带的基因序列可能整合进宿主基因组,带来致癌风险^[3]。其次,作为人工改造的病毒,病毒载体制备不易、储存运输环节要求严格,造成成本高昂^[4]。相反,非病毒载体具备许多优势,以普通质粒为例,其优点包括:(1)在细胞内以微染色体的形式存在,没有基因整合相关的致癌风险;(2)质粒在细菌(*E. coli*)体内,很容易大量扩增,制备成本低廉;(3)质粒 DNA 本身免疫原性很低,不会诱发炎症反应,受质粒转染的细胞不会被机体清除;(4)DNA 非常稳定,便于长期保存、长途运输。因此,非病毒载体越来越引起研究者的广泛关注^[2]。

然而,制约非病毒载体应用的最重要因素是其转染效率普遍低下^[2]。可喜的是,随着非病毒载体系统的不断优化,如质粒系统辅以脂质体、高分子聚合物等化学试剂或基因枪、电穿孔等物理手段,转染效率已大为提高,为临床推广打下了基础。

2 非病毒基因载体投递系统

2.1 化学转染:脂质体及高分子多聚物

阳离子脂质体对体外培养的细胞,转染效率极高,在细胞生物学实验中得到了广泛应用。阳离子脂质体带正电,可与带负电荷的 DNA 形成脂质体/DNA 复合物。一般认为阳离子脂质体主要通过介导脂质体/DNA 复合物与细胞膜融合,从而进入细胞。此外,配体-受体介导的细胞内吞作用也可能起到了一定的作用。除了进入细胞,DNA 从内涵体的释放是 DNA 转导中的另一障碍。一些脂质体能破坏内涵体、促进 DNA 的释放,从而提高转染效率。大量体外实验表明,脂质体能在多种细胞中获得高达 90% 以上的转染效率^[5]。然而脂质体在体内环境中却效果不佳、表现不尽如人意。甚至有研究发现,在投递等量 DNA 时,使用脂质体比裸 DNA 投递转染效率更低^[6]。研究者试图改造脂质体分子结构或者加大剂量以提高其转染率,而这些手段往往伴随着细胞毒性的增加。对于阳离子脂质体体内转染不佳的机制研究并不彻底,推测跟体内复杂的生理环境有关:如硫酸乙酰肝素广泛分布于胞外基质中,能与阳离子复合物发生电性结合,阻遏其进入细胞^[7]。

聚乙烯亚胺(Polyetherimide, PEI)是阳离子多聚物的典型代表。PEI 具有高正电荷密度,通过静电作用结合 DNA,缩合形成紧密的微粒结构,有利于被细胞通过内吞、胞饮等过程摄入^[8]。PEI 也可连上配体,提高转染率和靶向性;连上配体以后,可通过配体-受体介导的内化作用将外源基因转入靶细胞^[9]。比如,偶联半乳糖配体的 PEI 可用于靶向特异性识别肝细胞去唾液酸糖蛋白受体,从而特异性转染肝细胞^[10]。有研究表明,PEI/DNA 可用于小鼠肾、肺等组织的转染,然而对于肌肉组织的转染作用微弱^[11]。此外,Ito 等^[12]发现,PEI 不需与配体偶联,即 PEI 与透明

质酸(Hyaluronic Acid, HA)、DNA 三者混合, 注射小鼠肿瘤组织, 可大大提高报告基因转染效率, 暗示 PEI/HA/DNA 系统未来有望发展成肿瘤靶向药物; 然而是否能有效转染正常组织, 仍有待验证。PEI 等阳离子多聚物的疏水性也被认为是影响转染效率的一大因素, Fortune 等^[13]通过将 PEI 分子 N 端烷基化, 以增加疏水性, 实现了对小鼠肺、肝、心和肾等多种脏器的有效转染。

总之, 脂质体和阳离子多聚物存在的主要问题是转染效率低、表达时间短暂。目前的研究仅限于实验动物水平, 离临床应用要求尚有不小差距。

2.2 物理投递

2.2.1 皮内及肌肉注射

用质粒 DNA 转染皮肤和肌肉细胞, 是 DNA 疫苗最常用的给药途径^[14]。皮肤含有大量专职抗原递呈细胞: 树突状细胞和朗格汉斯细胞(Langerhans' cells)。其中, 朗格汉斯细胞属于未成熟的树突状细胞, 具有极强的吞噬能力, 推测可主动吞噬外源 DNA 并递呈至周围的淋巴结, 完成转染^[14]。采用皮内注射方式, 转染效率非常有限, 外源基因表达不强, 难以达到基因治疗所需的剂量水平, 因此多用于接种 DNA 疫苗。

肌肉注射是一种常见的基因治疗载体的投递方式, 多种肌肉类型都可获得转染, 包括横纹肌、心肌、平滑肌肉、横膈膜肌肉等^[15]。肌肉细胞摄入 DNA 的机制尚不明确^[15]。横纹肌接近体表, 且占体重 30% 左右, 是表达大量治疗性产物的基础, 因此, 是基因治疗最理想的靶细胞之一。肌肉可能还有另外的特性, 使其成为理想的基因治疗靶细胞: 几乎所有的体细胞的细胞核都位于细胞中间, 肌肉细胞核的位置很特别, 其核膜与细胞膜距离很近。这一特殊结构, 可能隐含肌肉相对较容易转染的机制, 至少基因载体进入细胞后, 无需像转染其他细胞一样要通过长距离的细胞浆才能进入细胞核。Wolff 等^[16]发现, 通过直接注射, 质粒 DNA 可扩散至整块肌肉,

穿过胞外基质和细胞膜, 进入肌纤维细胞; 他们认为 DNA 可能通过胞饮作用进入细胞。而 Budker 等^[17]推测, DNA 能通过受体介导的内吞作用进入细胞; 然而迄今并未在细胞表面鉴定出确定的 DNA 受体。肌纤维束被肌纤维膜包裹, 形成了 DNA 进入细胞的物理屏障, 可能是造成肌肉注射转染效率低下的一大原因。有报道^[18,19]表明, 肌肉注射只能有效转染约 1%~2% 的肌纤维。由于肌肉细胞是终末分化的细胞, 一旦转染, 不会因为细胞分裂造成外源 DNA 的丢失, 这种固有特性造成转染的肌细胞表达十分持久, 甚至长达数年。Wolff 和 Budker^[15]研究也表明, 多种因素会影响肌肉注射的转染率, 包括年龄、注射部位、剂量(DNA 量)、溶液体积、速度(压力)等。幼年小鼠比成年鼠更易转染, Danko 等^[20]发现, 2 周龄的 Balb/C 小鼠实现了高转染, 萤火虫荧光素酶基因表达比 8 周龄的强 30~120 倍, 比 20 周龄鼠则强达 1 200 倍; 而成年鼠肌肉经药物处理后的再生肌肉也能显著增强表达。Danko 等^[21]指出, 经 0.75% 布比卡因(bupivacaine)处理后的成年大鼠和小鼠对比未处理组, 萤火虫荧光素酶基因表达强 4~40 倍。DNA 剂量与转染率呈非线性的正相关。小鼠股直肌注射实验表明, 当 DNA 量小于 10 μg 时, 转染率随剂量增加而显著提高; 而当剂量达到 60 μg 时, 转染率趋向稳定, 此时增大剂量, 转染率不再提高。此现象似乎支持受体介导的内吞作用假说, 然而并未得到进一步的实验证据证实。注射体积和速度也可能跟转染率有关, 适当的增大注射体积和注射速度可能造成局部高压, 利于转染^[14]。然而 Wolff 等^[22]系统比较了注射针头型号、体积、速度等因素对转染率的影响, 并未发现大体积和高速可以显著提高转染率。

2.2.2 基因枪、电穿孔

皮内或肌肉注射投递裸 DNA 的方法十分简单方便, 却受限于转染效率不高, 有待优化。通

过调节注射部位、体积、速度等在一定程度上能促进转染，但仍无法满足临床要求。因此针对皮内注射和肌肉注射分别开发出基因枪和电穿孔的增强型转染技术。

基因枪是借助高速射出的金属微粒将附着于其表面的 DNA 导入受体细胞的一种转染技术^[23]。基因枪在植物遗传育种中应用广泛，已成功培育出水稻、玉米、小麦等多种作物的新品种。然而受限于射程，使用基因枪在动物体内投递 DNA，难以穿透肌外膜到达肌肉。Lin 等^[24]研究表明 DNA 包裹的金属颗粒从基因枪发出到达组织表面最多只有几百微米的距离，较深层组织不易到达。因此，基因枪法通常是将 DNA 导入皮肤，可在短时间内实现较高表达，但表达难以持久，目前仍限于在 DNA 疫苗领域的应用。

电穿孔 (Electroporation, EP) 技术的基本原理是在强脉冲电场的作用下，使细胞瞬时形成大量小孔，DNA 可通过小孔扩散至胞内^[25]。EP 在体外细胞转染中应用广泛，即使是使用脂质体难以转染的细胞中，也能实现高效转染。20 世纪 90 年代，Aihara 和 Miyazaki^[26]首次报道使用该技术成功实现 DNA 转染。此后，相关报道越来越多，证实借助电穿孔能在包括小鼠、大鼠、灵长类动物体内实现高效肌肉转染^[27]。然而，实现高效转染的前提是必须使用高压电场 (≥ 200 V/cm)，容易造成肌肉损伤、诱发免疫反应等副作用；此外，电穿孔技术依赖于大型特殊设备，是临床上大范围推广使用的一大不利因素^[6]。

2.3 载体改造

转染效率跟质粒 DNA 载体本身的序列构成以及大小也有关系。一般来说，DNA 载体越小越有利于转染。Zhang 等^[28]发现用等摩尔萤火虫荧光素酶表达载体转小鼠肌肉，5.7 kb 长的质粒比 11.4 kb 长的表达强 3 倍，而比 17.1 kb 的强约 4 倍。基因载体的体积与转染效率成反比。这很容易理解，因为载体越小，越容易通过细

胞间的结缔组织，扩散越广，转染越多细胞。显然，在保持基因表达框完整性的前提下，尽量缩小表达载体是增强转染的可行方式。普通质粒除基因表达框之外，还包含长达数 kb 的骨架 DNA 成分，包括：质粒 DNA 复制起始位点、抗生素抗性基因和 F1 复制序列。骨架成分只在 DNA 克隆、筛选时有用，对表达不仅无用，还会导致多种不利效应，包括引起转基因沉默和其富含甲基化 CpG 序列引起的炎症反应^[29]。因此，去除这些无用骨架成分即可大大减小载体，又可避免不利效应。Kay 等^[30]发明了微环 DNA 的制备技术，在细菌 (*E. coli* ZYCY10P3S2T) 体内实现了去除骨架 DNA 成分，最终所得的微环载体，只含有转基因表达所必须的表达框和 36 bp 重组序列 (attR)，能在体内长期、稳定、高效地表达目的基因，对比普通标准质粒，优势明显。

还有一些载体改造手段，虽不能促进 DNA 摄入，但能显著增强转基因的表达水平。研究^[31,32]表明，在增强子/启动子下游插入一段约 130 bp 的嵌合内含子 (Chimeric Intron, CI) 序列往往能显著增强转基因表达。CI 由人 β -球蛋白基因内含子 I 的 5' -剪切供体位点、剪接分枝位点以及免疫球蛋白基因重链可变区内含子 3' -剪切受体位点组成^[33]。Brondyk^[34]在 293T 细胞的瞬时转染实验中发现，插入 CI 能提高 CAT 基因表达近 20 倍，萤火虫荧光基因表达近 3 倍；在多种转基因动物体内发现，CI 有助于维持转基因产物的高表达^[35-37]。

WPRES (Woodchuck Hepatitisvirus Post-transcriptional Regulatory Element, 土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件) 是另外一种常见的增强表达的转录后调控元件。它通过增加 mRNA 稳定性，促进 mRNA 积累，从而增强目的基因表达^[38-40]。Zufferey 等^[41]最先报道将 WPRES 原件插入 poly A 序列前能明显增强转基因表达水平。

3 总 结

基因治疗的基本要求是在机体内持续表达高水平的治疗性蛋白产物。持续表达可以通过靶向肝脏、肌肉等组织而实现。因为肝细胞分化缓慢, 半衰期很长; 而肌肉细胞是分化后的细胞, 一旦转基因进入, 不会丢失、直至肌细胞死亡, 而肌细胞的寿命长达数年。然而 DNA 载体的存在并不能确保转基因的表达, 载体骨架序列引起的沉默效应可能关闭转基因的表达; 而去除此不利的骨架序列则能避免这种情况发生^[27]。虽然近年来技术的进步对提升转染率大有帮助, 但目前非病毒载体介导的基因治疗面临的最大困境仍然是转染效率的问题。前文总结了多种手段可增强转染, 其中效率最明显, 距离临床应用最近的应该是电穿孔技术。借助该技术, 转染率增加显著, 在包括非人灵长类动物在内的多个物种上, 实现了肌肉高效转染^[4]。然而, 即使是电穿孔, 仍面临着肌肉损伤和使用不便的问题。因此, 仍有待开发更方便可靠的高效投递体系。正因为如此, 导致具有多种优点的非病毒载体, 临床应用寥寥无几, 特别是未见有基于非病毒载体的基因治疗产品进入临床应用。目前, 批准进入市场以及进入临床实验阶段的非病毒载体产品, 主要集中在 DNA 疫苗领域。可能原因是: 相比治疗性基因产品, DNA 疫苗所需的表达水平相对较低, 现有最佳的 EP 等投递技术基本能满足要求。已有少数几种基于质粒-EP 技术的兽用 DNA 疫苗批准进入市场, 包括马西尼罗河病毒疫苗 (West Nile Innovator)、鱼传染性造血器官坏死病毒 (Apex-IHN)、狗黑色素瘤疫苗 (Canine Melanoma Vaccine)^[42]。近年来, 借助 EP 技术, 人用 DNA 疫苗也取得了一定进展。据统计, 截止 2017 年 1 月, 基于质粒-EP 技术的人用 DNA 疫苗进入临床试验阶段的已有超过 40 项 (ClinicalTrials.gov; <http://clinicaltrials.gov/>)。在

2014 年、2016 年报道基于质粒-EP 的人乳头瘤病毒 (Human Papillomavirus, HPV) DNA 疫苗^[43]和寨卡病毒 (Zika Virus; ZIKV) DNA 疫苗^[44]临床 I/II 期试验获得成功, 可望在不久的将来进入市场应用。DNA 疫苗的成功, 表明 EP 等技术部分解决了非病毒质粒载体的投递难题。然而, 基因产物发挥治疗作用往往需要更高的转染效率、更高的表达水平, 对非病毒载体投递系统提出了更高的要求。

微环 DNA 载体不到常规质粒一半大小, 且避免了由骨架 DNA 成分带来的多种不利效应^[29], 尤其适用于基因治疗。以此为基础, 我们正在发展新型的肌肉投递系统——MusFX (未发表数据)。MusFX 是一种临床批准的小分子化合物, 与 DNA 混合, 可形成 DNA/小分子复合物, 由于肌肉细胞表面有大量识别该小分子的受体, 从而通过受体介导的内吞作用将复合物摄入细胞, 完成转染, 再加上微环 DNA 的固有优势, 在小鼠体内实现了高效稳定表达。目前正继续优化此系统, 希望最终在临床应用上推广。

参 考 文 献

- [1] Naldini L. Gene therapy returns to centre stage [J]. *Nature*, 2015, 526(7573): 351-360.
- [2] Yin H, Kanasty RL, Eltoukhy AA, et al. Non-viral vectors for gene-based therapy [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2014, 15(8): 541-555.
- [3] Bouard D, Alazard-Dany D, Cosset FL. Viral vectors: from virology to transgene expression [J]. *British Journal of Pharmacology*, 2008, 157(2): 153-165.
- [4] Foldvari M, Chen DW, Nafissi N, et al. Non-viral gene therapy: gains and challenges of non-invasive administration methods [J]. *Journal of Controlled Release*, 2015, 240: 165-190.
- [5] Palchetti S, Pozzi D, Marchini C, et al. Manipulation of lipoplex concentration at the cell surface boosts transfection efficiency in hard-to-transfect

- cells [J]. *Nanomedicine*, 2016, 13(2): 681-691.
- [6] Lu QL, Bou-Gharios G, Partridge TA. Non-viral gene delivery in skeletal muscle: a protein factory [J]. *Gene Therapy*, 2003, 10(2): 131-142.
- [7] Ruponen M, Ronkko S, Honkakoski P, et al. Extracellular glycosaminoglycans modify cellular trafficking of lipoplexes and polyplexes [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(36): 33875-33880.
- [8] Longo PA, Kavran JM, Kim MS, et al. Transient mammalian cell transfection with polyethylenimine (PEI) [J]. *Methods in Enzymology*, 2013, 529(529): 227-240.
- [9] Ogris M, Steinlein P, Carotta S, et al. DNA/polyethylenimine transfection particles: influence of ligands, polymer size, and PEGylation on internalization and gene expression [J]. *AAPS PharmSci*, 2001, 3(3): 43-53.
- [10] Kunath K, Von Harpe A, Fischer D, et al. Galactose-PEI-DNA complexes for targeted gene delivery: degree of substitution affects complex size and transfection efficiency [J]. *Journal of Controlled Release*, 2003, 88(1): 159-172.
- [11] Godbey WT, Wu KK, Mikos AG. Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1999, 96(9): 5177-5181.
- [12] Ito T, Iida-Tanaka N, Koyama Y. Efficient in vivo gene transfection by stable DNA/PEI complexes coated by hyaluronic acid [J]. *Journal of Drug Targeting*, 2008, 16(4): 276-281.
- [13] Fortune JA, Novobrantseva TI, Klibanov AM. Highly effective gene transfection in vivo by alkylated polyethylenimine [J]. *Journal of Drug Delivery*, 2011: 204058.
- [14] Alarcon JB, Waine GW, McManus DP. DNA vaccines: technology and application as anti-parasite and anti-microbial agents [J]. *Advances in Parasitology*, 1999, 42(1): 343-410.
- [15] Wolff JA, Budker V. The mechanism of naked DNA uptake and expression [J]. *Advances in Genetics*, 2005, 54(1): 1-20.
- [16] Wolff JA, Dowty ME, Jiao S, et al. Expression of naked plasmids by cultured myotubes and entry of plasmids into T tubules and caveolae of mammalian skeletal muscle [J]. *Journal of Cell Science*, 1992, 103(6): 1249-1259.
- [17] Budker V, Budker T, Zhang G, et al. Hypothesis: naked plasmid DNA is taken up by cells in vivo by a receptor-mediated process [J]. *Journal of Gene Medicine*, 2000, 2(2): 76-88.
- [18] Davis HL, Demeneix BA, Quantin B, et al. Plasmid DNA is superior to viral vectors for direct gene transfer into adult mouse skeletal muscle [J]. *Human Gene Therapy*, 1993, 4(6): 733-740.
- [19] Dando TA, Disatnik MH, Zhou LZ. Rescue of dystrophin expression in mdx mouse muscle by RNA/DNA oligonucleotides [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000, 97(10): 5363-5368.
- [20] Danko I, Williams P, Herweijer H, et al. High expression of naked plasmid DNA in muscles of young rodents [J]. *Human Molecular Genetics*, 1997, 6(9): 1435-1443.
- [21] Danko I, Fritz JD, Jiao S, et al. Pharmacological enhancement of in vivo foreign gene expression in muscle [J]. *Gene Therapy*, 1994, 1(2): 114-121.
- [22] Wolff JA, Williams P, Acsadi G, et al. Conditions affecting direct gene transfer into rodent muscle in vivo [J]. *Biotechniques*, 1991, 11(4): 474-485.
- [23] Zhang D, Das DB, Rielly CD. Potential of microneedle-assisted micro-particle delivery by gene guns: a review [J]. *Drug Delivery*, 2014, 21(8): 571-587.
- [24] Lin MT, Pulkkinen L, Uitto J, et al. The gene gun: current applications in cutaneous gene therapy [J]. *International Journal of Dermatology*, 2000, 39(3): 161-170.
- [25] Gehl J. Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research [J]. *Acta Physiologica Scandinavica*, 2003, 177(177): 437-447.
- [26] Aihara H, Miyazaki J. Gene transfer into muscle by electroporation in vivo [J]. *Nature Biotechnology*, 1998, 16(9): 867-870.

- [27] Yarmush ML, Golberg A, Sersa G, et al. Electroporation-based technologies for medicine: principles, applications, and challenges [J]. *Annual Review Biomedical Engineering*, 2014, 16(16): 295-320.
- [28] Zhang G, Ludtke JJ, Thioudellet C, et al. Intraarterial delivery of naked plasmid DNA expressing full-length mouse dystrophin in the mdx mouse model of duchenne muscular dystrophy [J]. *Human Gene Therapy*, 2004, 15(8): 770-782.
- [29] Chen ZY, He CY, Ehrhardt A, et al. Minicircle DNA vectors devoid of bacterial DNA result in persistent and high-level transgene expression in vivo [J]. *Molecular Therapy*, 2003, 8(3): 495-500.
- [30] Kay MA, He CY, Chen ZY. A robust system for production of minicircle DNA vectors [J]. *Nature Biotechnology*, 2010, 28(12): 1287-1289.
- [31] Buchman AR, Berg P. Comparison of intron-dependent and intron-independent gene expression [J]. *Molecular & Cell Biology*, 1988, 8(10): 4395-4405.
- [32] Huang MT, Gorman CM. Intervening sequences increase efficiency of RNA 3' processing and accumulation of cytoplasmic RNA [J]. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18(4): 937-947.
- [33] Bothwell AL, Paskind M, Reth M, et al. Heavy chain variable region contribution to the NPb family of antibodies: somatic mutation evident in a gamma 2a variable region [J]. *Cell*, 1981, 24(3): 625-637.
- [34] Brondyk B. pCI and pSI mammalian expression vectors [J]. *Promega Notes*, 1994, 49: 7-11.
- [35] Brinster RL, Allen JM, Behringer RR, et al. Introns increase transcriptional efficiency in transgenic mice [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1988, 85(3): 836-840.
- [36] Choi T, Huang M, Gorman C, et al. A generic intron increases gene expression in transgenic mice [J]. *Molecular & Cellular Biology*, 1991, 11(6): 3070-3074.
- [37] Palmiter RD, Sandgren EP, Avarbock MR, et al. Heterologous introns can enhance expression of transgenes in mice [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1991, 88(2): 478-482.
- [38] Li K, Gao L, Gao H, et al. Codon optimization and woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhance the immune responses of DNA vaccines against infectious bursal disease virus in chickens [J]. *Virus Research*, 2013, 175(2): 120-127.
- [39] Garg S, Oran AE, Hon H, et al. The hybrid cytomegalovirus enhancer/chicken beta-actin promoter along with woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances the protective efficacy of DNA vaccines [J]. *Journal of Immunology*, 2004, 173(1): 550-558.
- [40] Loeb JE, Cordier WS, Harris ME, et al. Enhanced expression of transgenes from adeno-associated virus vectors with the woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element: implications for gene therapy [J]. *Human Gene Therapy*, 1999, 10(14): 2295-2305.
- [41] Zufferey R, Donello JE, Trono D, et al. Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors [J]. *Journal of Virology*, 1999, 73(4): 2886-2892.
- [42] Wahren B, Liu MA. DNA vaccines: recent developments and the future [J]. *Vaccines*, 2014, 2(4): 785-796.
- [43] Kim TJ, Jin HT, Hur SY, et al. Clearance of persistent HPV infection and cervical lesion by therapeutic DNA vaccine in CIN3 patients [J]. *Nature, Communications*, 2014, 5(5): 5317.
- [44] Morrison C. DNA vaccines against Zika virus speed into clinical trials [J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2016, 15(8): 521-522.