

网络出版时间: 2016-6-6 13:52:31 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160606.1352.004.html>

## survivin 启动子调控肿瘤干细胞标记 CD133 基因 siRNA 增殖型溶瘤腺病毒的构建及对肝癌细胞生长的抑制作用

牛 坚<sup>1</sup> 王 月<sup>1</sup> 刘 斌<sup>1</sup> 王人颢<sup>1</sup> 朱志军<sup>2</sup> 申海莲<sup>3</sup>

**摘要** 目的 构建 survivin 启动子调控的靶向 CD133 基因的 siRNA 增殖型溶瘤腺病毒,研究其对肝癌细胞生长的影响。方法 RT-PCR 法扩增 survivin 启动子,测序鉴定,双酶切连接,获得 pH-XC2-survivin。酶切 pH-XC2-survivin、pZD55-CD133-siRNA 获得 survivin 启动子表达框的亚克隆和 CD133-siRNA 基因表达框的亚克隆,连接获得 survivin 启动子调控的 siRNA 增殖型溶瘤腺病毒表达载体质粒 pT-ZD55-CD133-siRNA。增殖型溶瘤腺病毒 survivin-T-ZD55-CD133-siRNA 经 PCR 和测序鉴定。qRT-PCR 法检测 CD133 表达,Western blot 法检测 E1A、CCK-8 法检测细胞生长,流式细胞术检测细胞凋亡。结果 成功构建增殖型溶瘤腺病毒 survivin-T-ZD55-CD133-siRNA。qRT-PCR 法检测 CD133 mRNA 明显下降,Western blot 证实 survivin-T-ZD55-CD133-siRNA 在肿瘤细胞中表达 E1A 能抑制肝癌细胞 CD133 表达及生长。结论 构建的增殖型溶瘤腺病毒可有效降低肝癌细胞 CD133 的表达,用于肝癌基因治疗的进一步研究。

**主题词** 肝癌; 干细胞; CD133; 细胞增殖; 基因表达

**中图分类号** R 349.5

**文献标志码** A 文章编号 1000-1492(2016)07-0926-05

肿瘤干细胞是指存在于肿瘤组织中的数量很少但有干细胞性质的细胞群体<sup>[1-2]</sup>,在肿瘤的发生、发展中起重要作用,同时也在肿瘤耐药性、复发及转移的发生中发挥关键作用<sup>[3]</sup>。CD133 是肝癌干细胞表面特征性的标志物<sup>[4]</sup>。靶向性是肿瘤基因治疗的关键环节。实现靶向性的手段之一就是利用特异性的基因表达调控序列使治疗基因序列在肿瘤细胞中特异表达。survivin 基因的特点是在多种肿瘤细胞中表达水平高,但是在相应的正常组织少有表达<sup>[5]</sup>。据此可以利用 survivin 基因的启动子在肿瘤

细胞表达的特异性而作为肿瘤基因治疗的新的靶向性调控序列。该研究通过构建 survivin 基因启动子调控的针对 CD133 的 siRNA 增殖型溶瘤腺病毒,探讨该增殖型溶瘤腺病毒对人肝癌细胞系 Hep3B 的生物学行为影响,探索肝癌基因治疗的新的方法。

### 1 材料与方法

**1.1 材料** 293T 细胞、pH-XC2、pZD55、pZD55-EGFP、pZD55-CD133-siRNA 由上海交通大学附属仁济医院干细胞研究中心惠赠; 人肝癌细胞系 Hep3B (缺乏正常 p53 活性) 由徐州医学院附属医院肝病研究中心保存; E1A、E1B 一抗购自美国 Santa Cruz 公司; CCK-8 试剂盒购自日本 DOJINDO 公司。

**1.2 survivin 启动子的 RT-PCR 扩增及鉴定** 根据 survivin 启动子序列设计一对引物,上游引物: 5'-ACGTTACGTACCGCTTCTTGAAAGCAGTC-3',下游引物: 5'-TATACTCGAGCCAGGCAGGGGGAACGT-3';以上引物分别含有 SnaB I 和 Xho I 限制性酶切位点。以 HeLa 细胞的基因组 DNA 为模板,RT-PCR 扩增 survivin 启动子。PCR 产物回收纯化同时测序分析。

**1.3 穿梭质粒 pH-XC2-survivin 的构建** survivin 启动子 PCR 扩增产物以 SnaB I 和 Xho I 分别双酶切,连接至同样双酶切的 pH-XC2(E1A 区缺少启动子的增殖型溶瘤腺病毒质粒)中,转化大肠杆菌,扩增,用转 EcoR I 和 BamH I 双酶切鉴定,测序,提取质粒名为 pH-XC2-survivin。

**1.4 穿梭质粒 survivin-pT-ZD55-CD133-siRNA 的构建** EcoR V、Cla I 酶切 pH-XC2-survivin 获得包含 survivin 启动子表达框的亚克隆; EcoR V、Cla I 酶切 pZD55-CD133-siRNA 获得包含 CD133-siRNA 基因表达框的亚克隆; 上述 2 个亚克隆进行连接,获得 survivin-pT-ZD55-CD133-siRNA。

**1.5 病毒的包装、鉴定** 将质粒 survivin-pT-ZD55-CD133-siRNA、pZD55-EGFP 分别与腺病毒右臂质粒 pBHGE3,通过 Lipofectamin2000 共转染 293T 细胞,经过病毒空斑纯化,包装成完整病毒颗粒。提取重

2016-04-16 接收

基金项目: 天晴甘美基金项目资助(编号: CFHPC20132020); 江苏省 333 人才项目(编号: III-2290); 徐州市重大科研项目(编号: KC14SX011)

作者单位: <sup>1</sup> 徐州医学院附属医院肝胆病研究中心,徐州 221002

<sup>2</sup> 北京友谊医院肝胆外科,北京 100000

<sup>3</sup> 上海交通大学附属同济医院干细胞研究中心,上海 200000

作者简介: 牛 坚,男,副教授,责任作者,E-mail: njnj\_001@163.com

组病毒 DNA 测序鉴定正确者,即为目的病毒 survivin-ZD55-CD133-siRNA、ZD55-EGFP。

**1.6 survivin-ZD55-CD133-siRNA 的 PCR 鉴定** 病毒感染细胞,待细胞病变后,收集细胞上清液,抽提病毒 DNA。RT-PCR 检测重组腺病毒是否插入目的基因,上游引物: 5'-TCGTTTACTGAACCGT-CAGATC-3',下游引物: 5'-ACACGGTCTCGTAGGT-CAAG-3',反应产物经琼脂糖凝胶电泳分析。

**1.7 病毒滴度的测定** 病毒滴度的测定参考文献<sup>[6]</sup>。

**1.8 细胞培养及分组** 细胞用含 10% 的小牛血清 DMEM 常规培养,实验所用细胞均处在对数生长期。根据实验要求分为:① Blank 组: Hep3B; ② shNC 组: Hep3B-ZD55-EGFP; ③ shCD133 组: Hep3B-survivin-ZD55-CD133-siRNA。

**1.9 荧光定量 PCR 检测 CD133 在 mRNA 水平的变化** 将 Hep3B 细胞低密度铺于 6 孔板,1 d 后用感染复数(multiplicity of infection, MOI)=10 的 survivin-pT-ZD55-CD133-siRNA 感染细胞,48 h 后 TR-Izol 法提取各组细胞的总 RNA,按反转录试剂盒说明进行反转录。引物序列为上游引物: 5'-TGCT-CAGAACITCATCACAAACAAT-3',下游引物: 5'-TAGGACAATACTGTTGGGTAGTGT-3';内参  $\beta$ -actin 上游引物: 5'-GTGAAGGTGACAGCAGTCGGTT-3',下游引物: 5'-CAGTGTACAGGTAAGCCCTG-3'。qRT-PCR 循环参数: 第一步 95 °C 预变性 30 s,1 个循环; 第二步 95 °C、5 s,60 °C、30 s,40 个循环; 第三步: 熔解曲线 95 °C、15 s,60 °C、1 min,95 °C、15 s。数值分析采用最大二阶导数法( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )分析。

#### 1.10 Western blot 法检测 E1A、E1B 蛋白表达

将 Hep3B 细胞低密度铺于 6 孔板 24 h 后用 MOI=10.0 的 survivin-ZD55-CD133-siRNA 感染细胞,48 h 后提取蛋白和蛋白缓冲液混合,煮沸后上检测蛋白样品,进行 SDS-PAGE 电泳。电泳停止后,电转移法将细胞蛋白分离到 PVDF 膜上。一抗(1:1 000),二抗(1:5 000)室温孵育后,PVDF 膜用 ECL 发光检测盒反应并在暗室显影。

**1.11 survivin-ZD55-CD133-siRNA 对 Hep3B 细胞增殖的影响** 具体操作参照 Cell Counting Kit-8 试剂盒操作说明。在酶联免疫测试仪上测定各样品吸光度(optical density, OD)值绘制生长曲线,计算各组实验对象 1 周的扩增情况。每孔设 3 个复孔。

**1.12 细胞凋亡检测** 转染 24 h 后,收集 Blank 组、shNC 组和 shCD133 组细胞后加入 20 ng/ml 表皮生

长因子(ECF) 及 10 ng/ml 成纤维细胞生长因子(bFGF) 的无血清 DMEM 培养液,培养 96 h 后,用 AnnexinV/FITC 和 PI 染色,样品用流式细胞仪分析检测细胞凋亡情况。

**1.13 统计学处理** 采用 SAS 6.12 软件进行方差和 t 检验分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。

## 2 结果

**2.1 survivin 启动子有效片段 PCR 扩增** 以 HeLa 细胞 DNA 为模板,PCR 扩增 survivin 启动子有效片段,产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳,得到约 298 bp 大小的 DNA 片段,见图 1。经测序验证正确。

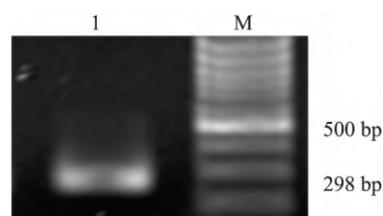


图 1 survivin 启动子片段 PCR 电泳图  
M: DNA Marker; 1: PCR 产物

**2.2 survivin-ZD55-CD133-siRNA 鉴定和滴度测定** 用 survivin-ZD55-CD133-siRNA 病毒 DNA 作为 PCR 反应模板,产物经琼脂糖凝胶电泳分析,可观察到在约 500 bp 的位置有一条带,与作为阳性对照的 pT-ZD55-CD133-siRNA 相同,与作为阴性对照的 pZD55 在约 436 bp 的位置有一条带,表明 survivin-ZD55-CD133-siRNA 含有干扰序列。见图 2。

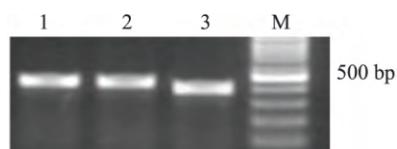


图 2 增殖型溶瘤腺病毒 survivin-ZD55-CD133-siRNA 鉴定  
M: DNA Marker; 1: survivin-ZD55-CD133-siRNA; 2: pT-ZD55-CD133-siRNA; 3: pZD55

**2.3 Western blot 法检测结果** E1A 基因保留了病毒在肿瘤细胞中的复制能力。剔除了 E1B(55 kDa) 基因,使病毒不能在正常细胞内复制。这两个方面都需要验证。结果表明,增殖型溶瘤腺病毒 survivin-ZD55-CD133-siRNA、ZD55-EGFP 感染 Hep3B 细胞 48 h 后,可以检测到 E1A 的表达,而 Hep3B 组没有 E1A 的表达。同时实验显示 3 组无 E1B 的表达。见图 3。

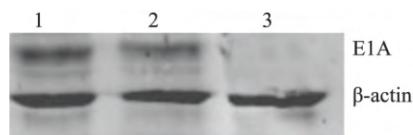


图3 Western blot 法检测 Hep3B 感染增殖型溶瘤腺病毒后 E1A 蛋白的表达

1: survivin-ZD55-CD133-siRNA; 2: ZD55-EGFP; 3: Hep3B

**2.4 qRT-PCR 检测结果** 各组重组增殖型溶瘤腺病毒颗粒转染人肝癌细胞 Hep3B 后 ,qRT-PCR 结果显示: 以 Blank 组表达量为 1 ,shCD133 组相对 Blank 组的 CD133 表达量的平均值为  $0.18 \pm 0.04$  ,CD133 的相对表达量下调了 80% ,shNC 组相对 Blank 组表达量的平均值为  $0.96 \pm 0.06$  。 shCD133 组相对 Blank 组有显著的敲减作用(  $F = 25.9$  , $P < 0.05$  ) ,Blank 组和 shNC 组表达量差异无统计学意义。

**2.5 增殖型溶瘤腺病毒 survivin-ZD55-CD133-siRNA 对 Hep3B 细胞增殖的影响** shCD133 组、Blank 组和 shNC 组细胞生长曲线显示 shCD133 组细胞生长明显减慢(  $P < 0.05$  )。见图 4。

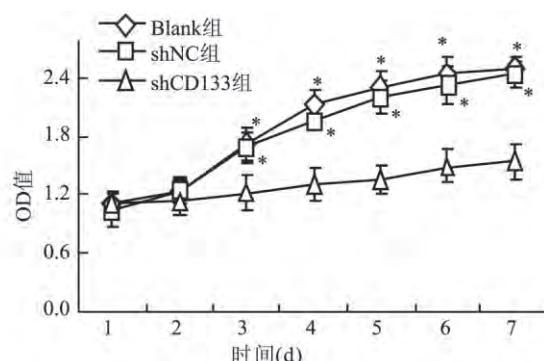


图4 shCD133 组、Blank 组和 shNC 组生长曲线

与 shCD133 组比较: \*  $P < 0.05$

**2.6 增殖型溶瘤腺病毒 survivin-ZD55-CD133-siRNA 对 Hep3B 细胞凋亡的影响** 为了探讨增殖型溶瘤腺病毒 survivin-ZD55-CD133-siRNA 对肝癌细胞的增殖抑制作用是否依赖细胞凋亡性死亡 ,本研究采用 AnnexinV/PI 染色分析细胞凋亡情况。结果表明 ,与 Blank 组( 25.3% , $F = 36.9$  , $P < 0.05$  )、shNC( 24.3% , $F = 46.9$  , $P < 0.05$  )比较 ,shCD133 组细胞阳性凋亡比例( 41.3% )显著增加( 图 5)。

### 3 讨论

肿瘤的发生、发展、转移及复发的关键是由那些能自我更新、无限增殖及多向分化潜能的干细胞亦即肿瘤干细胞引起的。肿瘤干细胞在很多实体瘤中普遍存在<sup>[7-8]</sup>。

CD133 是一个 5 次跨膜糖蛋白 ,表达在未分化细胞和肿瘤细胞 ,是最重要的肿瘤干细胞标志物。CD133 分子在胰腺癌<sup>[9-10]</sup>、肝细胞肝癌<sup>[11]</sup> 及结直肠癌<sup>[12]</sup> 等肿瘤组织中有明显表达 ,通过对肿瘤细胞膜突起的改变而影响细胞的极性、迁移及与相邻细胞的作用<sup>[13]</sup>。本实验通过构建增殖型溶瘤腺病毒 survivin-ZD55-CD133-siRNA 沉默 CD133 基因 ,为 CD133 基因的功能研究提供有效手段。

肿瘤基因治疗的难点是将治疗基因特异且高效的导入癌细胞中 ,同时实现在肿瘤细胞中高表达 ,这就要求构建高靶向性的载体 ,这也是肿瘤基因治疗中被高度关注的领域<sup>[14]</sup>。近年增殖型溶瘤腺病毒成为研究的热点之一 ,以其为基础构建肿瘤基因治疗的载体 ,优点是可以充分利用腺病毒颗粒较小、扩散能力快的特点 ,与此同时大量扩增的病毒可以直接分解被感染的肿瘤细胞 ,还能感染附近的肿瘤细胞。增殖型溶瘤腺病毒载体一方面在肿瘤细胞内特异性扩增 ,另一方面还能将嵌合的外源基因的表达量放大成千上万倍 ,这极大增加了肿瘤的治疗效

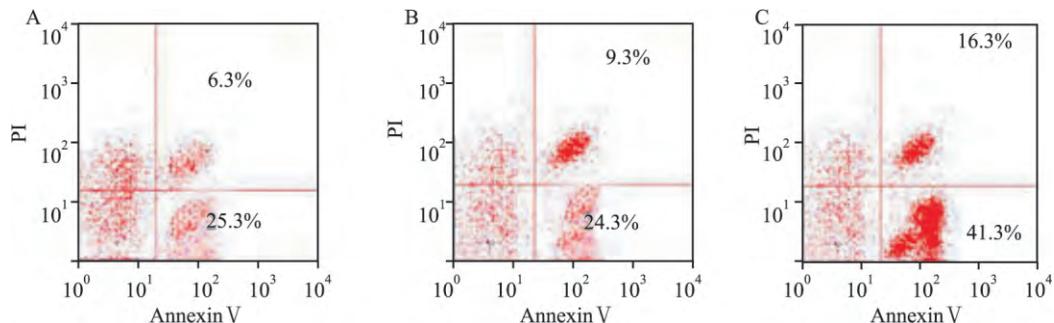


图5 AnnexinV/PI 检测 survivin-ZD55-CD133-siRNA 对 Hep3B 细胞凋亡影响

A: Blank 组; B: shNC 组; C: shCD133 组

果 现已有利用增殖型腺病毒治疗肿瘤的实验报道<sup>[15]</sup>。本实验显示增殖型溶瘤腺病 ZD55-EGFP 对 Hep3B 细胞的生长有明显抑制作用。

治疗基因进入细胞，在细胞内高效、特异的表达，是需要解决的重要问题，而利用肿瘤细胞的特异性启动子控制治疗基因表达，是实现肿瘤基因治疗的重要手段。

本研究成功构建 survivin 启动子替换表达 CD133-siRNA 的增殖型腺病毒 ZD55-CD133-siRNA 的 E1A 启动子 经 PCR、测序鉴定证实 survivin 启动子调控靶向 CD133 基因 siRNA 增殖型腺病毒 survivin-ZD55-CD133-siRNA 构建成功。对肝癌 Hep3B 细胞进行体外研究表明构建的靶向 CD133 基因 siRNA 增殖型腺病毒对 Hep3B 细胞的生长有明显抑制作用 较对照组更易诱导细胞凋亡。本研究所改造的增殖型腺病毒表达载体在基础研究和应用研究中都有重要的作用。

## 参考文献

- [1] Hu M , Xiang F X , He Y F. Are cancer stem cells the sole source of tumor[J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2014 ,34 (5) : 621 -5.
- [2] Michishita M , Ezaki S , Ogihara K , et al. Identification of tumor-initiating cells in a canine hepatocellular carcinoma cell line [J]. *Res Vet Sci* 2014 ,96(2) : 315 -22.
- [3] Hao P P , Lee M J , Yu G R , et al. Isolation of EpCAM( + ) / CD133 ( - ) hepatic progenitor cells [J]. *Mol Cells* ,2013 ,36 (5) : 424 -31.
- [4] Romano M , De Francesco F , Pirozzi G , et al. Expression of cancer stem cell biomarkers as a tool for a correct therapeutic approach to hepatocellular carcinoma [J]. *Oncoscience* ,2015 ,2(5) : 443 -56.
- [5] Li Z L , Ueki K , Kumagai K , et al. Regulation of bcl-2 transcription by estrogen receptor-alpha and c-Jun in human endometrium [J]. *Med Mol Morphol* 2014 ,47(1) : 43 -53.
- [6] Sassone F , Margulets V , Maraschi A , et al. Bcl-2/adenovirus E1B 19-kDa interacting protein (BNip3) has a key role in the mitochondrial dysfunction induced by mutant huntingtin [J]. *Hum Mol Genet* 2015 ,24(22) : 6530 -9.
- [7] Liao W T , Ye Y P , Deng Y J , et al. Metastatic cancer stem cells: from the concept to therapeutics [J]. *Am J Stem Cells* ,2014 ,3 (2) : 46 -62.
- [8] Mertins S D. Cancer stem cells: a systems biology view of their role in prognosis and therapy [J]. *Anticancer Drugs* ,2014 ,25 (4) : 353 -67.
- [9] Tanase C P , Neagu A I , Necula L G , et al. Cancer stem cells: involvement in pancreatic cancer pathogenesis and perspectives on cancer therapeutics [J]. *World J Gastroenterol* ,2014 ,20(31) : 10790 -801.
- [10] Tang S C , Chen Y C. Novel therapeutic targets for pancreatic cancer[J]. *World J Gastroenterol* 2014 ,20(31) : 10825 -44.
- [11] Tu T , Budzinska M A , Maczurek A E , et al. Novel aspects of the liver microenvironment in hepatocellular carcinoma pathogenesis and development [J]. *Int J Mol Sci* 2014 ,15(6) : 9422 -58.
- [12] Ren F , Sheng W Q , Du X. CD133: a cancer stem cells marker , is used in colorectal cancers[J]. *World J Gastroenterol* 2013 ,19 (17) : 2603 -11.
- [13] Gaedicke S , Braun F , Prasad S , et al. Noninvasive positron emission tomography and fluorescence imaging of CD133<sup>+</sup> tumor stem cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* ,2014 ,111(6) : 692 -701.
- [14] 赵明 范楚玲 郭强 等. RunX2 的真核表达载体的构建及其对乳腺癌细胞增殖和迁移的影响 [J]. 安徽医科大学学报 ,2015 ,50(11) : 1593 -6.
- [15] Jian W , Zhong L , Wen J , et al. SEPTIN2 and STATHMIN regulate CD99-mediated cellular differentiation in Hodgkin's lymphoma [J]. *PLoS One* 2015 ,10(5) : e0127568.

## Construction and identification of replication-competent adenovirus expressing siRNA targeting CD133 gene regulated by survivin promoter and its inhibition of liver cancer cell growth

Niu Jian , Wang Yue , Liu Bin , et al

(Liver Disease Research Center ,The Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College ,Xuzhou 221004 )

**Abstract Objective** To construct a replication-competent adenovirus expressing siRNA targeting CD133 gene regulated by survivin promoter and investigate its inhibitory effect on Hep3B cells. **Methods** The fragment of the survivin promoter was amplified by PCR and inserted into pH-XC2 to reconstruct a recombinant plasmid pH-XC2-survivin. Complete digestion pH-XC2-survivin and pZD55-CD133-siRNA , combinational joining the subclones , then getting replication-competent adenovirus expressing short interference RNA targeting CD133 gene regulated by

网络出版时间: 2016-6-6 13:52:31 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160606.1352.006.html>

## 沉默 Ska2 基因对人胶质瘤细胞增殖的影响

贺小军, 马春春, 卞尔保, 王洪亮, 宗钢, 赵兵

**摘要** 目的 采用 siRNA 沉默 Ska2 基因, 探讨其对人胶质瘤细胞生长的影响及其潜在的分子机制。方法 对照组人胶质瘤细胞予以 siRNA 阴性序列转染, 实验组予以 siRNA-Ska2 序列转染。每组细胞转染 48 h 后应用实时荧光定量聚合酶链式反应 (qRT-PCR) 分析 Ska2 mRNA 表达情况。Western blot 法分析 Ska2、PCNA 和 Cyclin D1 蛋白表达情况, MTT 法及细胞克隆实验分析 Ska2 对 A172 细胞增殖及克隆形成能力的影响。结果 qRT-PCR 结果显示实验组 Ska2 mRNA 表达较对照组显著减少 ( $P < 0.01$ ), Western blot 结果显示实验组 Ska2、PCNA 和 Cyclin D1 蛋白表达水平亦较对照组显著降低 ( $P < 0.01$ )。MTT 实验显示实验组中活细胞数明显低于对照组 ( $P < 0.05$ ); 细胞克隆法显示实验组细胞的增殖克隆形成能力明显低于对照组 ( $P < 0.01$ )。结论 沉默 Ska2 基因、减少人胶质瘤细胞 Ska2 基因的表达能够抑制胶质瘤细胞的增殖。

**关键词** Ska2; 胶质瘤; 细胞增殖

**中图分类号** R 739.41

**文献标志码** A 文章编号 1000-1492(2016)07-0930-05

### 纺锤体与动粒相关复合物( spindle and kine-

2016-03-23 接收

基金项目: 国家自然科学基金青年基金( 编号: 81402078, 81502149);

安徽省自然科学基金项目( 编号: 1508085MH194)

作者单位: 安徽医科大学第二附属医院神经外科, 合肥 230601

作者简介: 贺小军, 男, 硕士研究生;

赵兵, 男, 副教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: zhaopumcmd@yeah.net

chore associated complex, Ska) 包括 Ska1、Ska2 和 Ska3<sup>[1]</sup>。Hanisch et al<sup>[2]</sup> 发现了 Ska1, 并通过酵母双杂交技术进一步筛选得到一个新的能够与 Ska1 结合的蛋白即 FAM33A, 将其重新命名为 Ska2。近年, Ska 家族的第 3 个成员 Ska3 也几乎同时被发现并报道<sup>[3]</sup>。Ska2 是一个最近鉴定的参与细胞周期调控与肿瘤发生发展的新基因<sup>[2-4]</sup>。Ska2 在细胞周期中的作用, 目前认为该基因可通过与 Ska1、Ska3 形成 Ska 复合体, 维持有丝分裂中期赤道板和关闭纺锤体检测点, 保证细胞能够“适时”完成有丝分裂中期并进入有丝分裂后期<sup>[2-5]</sup>。Hanisch et al<sup>[2]</sup> 采用 RNA 干扰技术抑制 Ska2 表达后, 大量细胞被停滞或延迟在有丝分裂中期, 虽然细胞仍能最终完成有丝分裂, 但细胞从有丝分裂前期进入后期所需的时间明显延长。Shi et al<sup>[6]</sup> 发现 Ska2 在小细胞肺癌和乳腺癌中呈现表达上调。此外, Ska2 还可通过糖皮质激素受体等途径参与细胞增殖调节和肿瘤发生发展<sup>[7-10]</sup>。然而, Ska2 基因在人胶质瘤的作用尚未见文献报道, 该研究旨在探讨 siRNA 沉默 Ska2 后对人胶质瘤 A172 细胞增殖的影响, 为进一步深入研究 Ska2 在胶质瘤中的作用机制奠定基础。

### 1 材料与方法

**1.1 主要材料及试剂** 人胶质瘤细胞株 A172 购自上海生命科学研究院细胞库; 培养基 DMEM、胎牛

survivin promoter, replication-competent adenovirus was constructed. The recombined adenoviruses ( T-ZD55-CD133-siRNA) were verified by PCR and sequencing. The effect of T-ZD55-CD133-siRNA on CD133 expression in Hep3B cells was detected by qRT-PCR. The expression of E1A was detected by Western blot. The antitumor potential of replication-competent adenovirus in Hep3B cells were evaluated by CCK-8 assay and cell apoptosis was detected by Flow cytometry. **Results** Replication-competent adenovirus were constructed successfully. Western blot analyses indicated that T-ZD55-CD133-siRNA might express E1A in adenovirus-infected Hep3B cells. T-ZD55-CD133-siRNA were more effective to inhibit CD133 mRNA expression and Hep3B cells proliferation. Apoptosis was significantly increased in the interference group compared with the control group. **Conclusion** Survivin-T-ZD55-CD133-siRNA expressing CD133-siRNA can inhibit CD133 expression and may be used for further investigation of gene therapy for liver cancer.

**Key words** liver cancer; cancer stem cell; CD133; cell proliferation; gene expression