

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2007)05-0385-05

细菌内同源重组快速构建和制备表达 hSDF-1 α 的重组腺病毒唐俊明^{1,2} 郭凌郎¹ 孔 霞¹ 杨建业¹ 潘国栋¹ 陈 龙¹ 黄永章¹ 王家宁¹(郧阳医学院: 附属人民医院临床医学研究所,² 生理学教研室, 湖北 十堰 442000)Construction of recombinant adenoviral plasmid bearing hSDF-1 α cDNA by homologous recombination in bacteria and preparation of recombinant adenovirus expressing hSDF-1 α TANG Jun-Ming^{1,2}, GUO Ling-Yun¹, KONG Xia¹, YANG Jian-Ye¹, PAN Guo-Dong¹, CHEN Long¹, HUANG Yong-Zhang¹, WANG Jia-Ning¹¹Institute of Clinical Medicine, People's Hospital, ²Department of Physiology, Yunyang Medical College, Shiyan 442000, China

【Abstract】 AIM: To construct recombinant adenoviral plasmid containing hSDF-1 α cDNA using homologous recombination in bacteria and to prepare recombinant adenovirus expressing hSDF-1 α . METHODS: Adenoviral backbone plasmid was transformed into competent BJ5183 and the competent BJ5183 transformed with pAdEasy-1 was prepared. The linearized pShuttle-EGFP-hSDF-1 α plasmid with Pme I digestion and CIAP dephosphorylation was transformed into the competent cells BJ5183 transformed with pAdEasy-1. The identified recombinant adenoviral plasmid pAd-EGFP-hSDF-1 α was digested with Pac I and transfected into AD293 cells with cationic liposome LipoVec to package recombinant adenovirus Ad-EGFP-hSDF-1. Ad-EGFP-hSDF-1 α was propagated by repeated rounds of infection of AD293 cells with supernatant of the recombinant adenovirus. Ad-EGFP-hSDF-1 α was purified with CsCl density gradient ultracentrifugation. RESULTS: pShuttle-EGFP-hSDF-1 α was successfully transformed into competent BJ5183 transformed with pAdEasy-1 and homologous recombination between pAdEasy-1 and pShuttle-EGFP-hSDF-1 α took place within BJ5183 bacteria. Liposome-mediated transfection of pAd-EGFP-hSDF-1 α digested with Pac I into AD293 cells was performed. The packaging of recombinant adenovirus Ad-EGFP-hSDF-1 α within AD293 cells was confirmed

收稿日期 2006-08-22; 接受日期 2006-10-16

基金项目 湖北省自然科学基金(2005ABA079); 郧阳医学院科研启动基金(2005QDJ01); 湖北省卫生厅基金(JX2B68); 湖北省教育厅基金(Q200524003, B200624006)

通讯作者: 王家宁. Tel (0719) 8637170 Email rywjn@vip.163.com

作者简介: 唐俊明. 硕士, 讲师. Tel (0719) 8637170 Email tangjm416@163.com

by fluorescent microscopy. The viral titer was 4.1×10^{15} pfu/L. CONCLUSION: The recombinant adenovirus expressing hSDF-1 α was prepared successfully by a simple and rapid homologous recombination in bacteria. This study provides a basis for exploring the migration mechanism of bone marrow-derived stem cells into injured tissue such as infarcted myocardium.

【Keywords】 homologous recombination; hSDF-1 α ; adenovirus; gene therapy

【摘要】 目的 利用细菌内同源重组快速构建携带 hSDF-1 α cDNA 重组腺病毒质粒和制备表达 hSDF-1 α 重组腺病毒. 方法: 制备感受态 BJ5183 将 pAdEasy-1 转化 BJ5183 制备含 pAdEasy-1 的 BJ5183 感受态, 将线性化的 pShuttle-EGFP-hSDF-1 α 转化含 pAdEasy-1 的 BJ5183 感受态菌. 采用细菌中同源重组法构建重组腺病毒质粒 pAd-EGFP-hSDF-1 α . pAd-EGFP-hSDF-1 α 用 Pac I 线性化后, 再用 LipoVec 介导其转染至 AD293 细胞内包装扩增出重组腺病毒颗粒, 采用 CsCl 密度梯度离心法纯化重组腺病毒 Ad-EGFP-hSDF-1 α . 采用荧光显微镜下观察 LipoVec 介导的重组腺病毒质粒的转染效果及病毒包装情况. 结果: pShuttle-EGFP-hSDF-1 α 成功地转化了含 pAdEasy-1 的 BJ5183 并在其内发生了同源重组. 荧光显微镜下观察证实了 pAd-EGFP-hSDF-1 α 转染 AD293 后, 产生了重组腺病毒 Ad-EGFP-hSDF-1 α . 病毒滴度为 4.1×10^{15} pfu/L. 结论: 用细菌内同源重组法可快速、高效制备表达 hSDF-1 α 的高滴度重组腺病毒. 为研究 hSDF-1 α 在动员骨髓源干细胞迁移到组织损伤部位修复组织损伤的研究奠定了基础.

【关键词】 同源重组; 基质细胞源衍生因子-1; 腺病毒; 基因治疗

【中图分类号】Q784

【文献标识码】A

0 引言

基质细胞源衍生因子-1(stromal derived factor-1, SDF-1)属 CXC 型趋化因子. 同基因编码两种蛋白: SDF-1 α 和 SDF-1 β , 其受体 CXC 型趋化因子受体 4 (CXC chemokine receptor 4, CXCR4) 是一个具有 7 个跨膜结构域的 G 蛋白耦联的受体^[1]. 研究发现 SDF-1 α 是 CD34⁺ 造血干细胞的趋化因子, CD34⁺ 造血干细胞能沿 SDF-1 浓度梯度向骨髓迁移实现归巢^[1-3]. 同时, SDF-1 在骨髓动员中也发挥了重要作用^[4-6]. 而已知骨髓内除了含有造血干细胞外, 至少

还含有内皮祖细胞、间充质干细胞。近来研究表明移植的内皮祖细胞、间充质干细胞通过参与或促进血管新生和心肌再生而明显改善了受损心脏的功能。但是国内外关于 hSDF-1 α 动员骨髓源内皮祖细胞、间充质干细胞的作用研究很少,尤其 hSDF-1 α 在心肌梗死后动员骨髓源间充质干细胞靶向迁移到心梗部位的作用研究更是甚少。因此,为进一步探索 hSDF-1 α 在骨髓动员、迁移中的作用,非常有必要制备表达 hSDF-1 α 的重组腺病毒。

1 材料和方法

1.1 材料 ① 质粒与菌株 pORF-hSDF-1 α 质粒、脂质体 LipoVec 购自 Invivogen 公司;腺病毒骨架质粒 pAdeasy-1,穿梭质粒 pShuttle-IRES-hrGFP-2,AD293, BJ5183 和 XL10-gold 购自 Stratagene 公司;pGEM-T Easy vector 购自 Promega 公司;DH5 α 由南阳医学院临床医学研究所保存;② 限制性内切酶: *EcoR* V, *Xho* I, *Pac* I 和 *Pme* I 购自 New England Biolabs 公司; λ DNA *Hind* III marker, 200 bp DNA ladder, dNTP, Taq 酶、T4 DNA 连接酶购自华美生物工程公司; hSDF-1 α cDNA 扩增引物:上游引物为 5' GAT ATC ATG AAC GCC AAG GTC GTG GTC 3',下游引物为 5' CTC GAG TTA CTT GTT TAA AGC TTT CTC 3'由北京赛百盛生物公司设计合成,上游、下游引物 5'端分别带有 *EcoR* V, *Xho* I 位点;③ 仪器:高速冷冻离心机(UNIVERSAL 32R,德国),超速冷冻离心机(Hitachi, CP80MX,日本),倒置相差荧光显微镜(Nikon, TE2000-U,日本),PCR 仪(Biometra,德国),紫外/可见光分光光度计(Cecil, CE2041,英国),台式高速冷冻离心机、水浴摇床等。

1.2 方法

1.2.1 hSDF-1 α cDNA 的扩增 以 pORF-hSDF-1 α 为模板,20 mmol/L 的上下游引物各 5 μ L, pfu DNA 聚合酶 1 μ L, 10 \times buffer 5 μ L, 10 \times dNTP 5 μ L, 加双蒸水至总反应体积 50 μ L。进行聚合酶链(polymerase chain reaction, PCR)反应:起始变性 94 $^{\circ}$ C 5 min,然后执行 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 30 次循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.2.2 “T”连接反应 参照本所已建立的方法^[7-8]将回收纯化的 279 bp PCR 产物,加入 10 \times PCR buffer 5 μ L, 10 \times MgCl₂ 5 μ L, 2 mmol/L dATP 2 μ L, Taq 酶 2 μ L, 加双蒸水至总反应体积 50 μ L, 72 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。回收纯化加“A”后的 hSDF-1 α cDNA 片断(281 bp)加 10 \times T4 DNA 连接 buffer 5 μ L, pGEM-T Easy vector 0.5 μ L, T4 DNA 连接酶 1 μ L, 加

双蒸水至总反应体积 10 μ L, 室温连接 3 h。将连接产物转化 DH5 α , 涂布含氨苄青霉素(100 mg/L)的 LB 琼脂培养基上培养 12 h, 蓝白筛选, 挑选白色单菌落接种于含氨苄青霉素(100 mg/L)的 TB 培养基中培养 12 h, 提取质粒 *EcoR* V 和 *Xho* I 酶切鉴定。重组质粒命名为 pGEM-T-hSDF-1 α 。

1.2.3 穿梭质粒 pShuttle-EGFP-hSDF-1 α 的构建 将 pShuttle-IRES-HrGFP-2 和 pGEM-hSDF-1 α 分别用 *EcoR* V/*Xho* I 双酶切后, 低熔点琼脂糖凝胶电泳, 分别回收 8.8 kb 的穿梭质粒片段和 279 bp 的 hSDF-1 α cDNA, 用 T4 连接酶连接过夜。然后转化感受态 DH5 α , 小量培养, 经酶切鉴定正确后大量培养, 抽提质粒 DNA 备用。

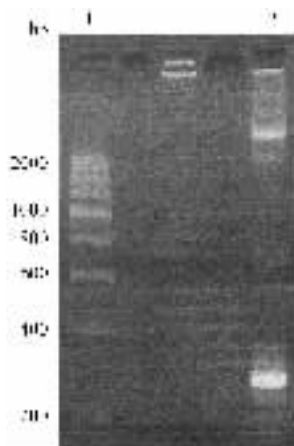
1.2.4 pAd-EGFP-hSDF-1 α 重组腺病毒质粒的制备 取 1.0 μ g 的腺病毒骨架质粒 pAdeasy-1 转化感受态 BJ5183, 挑取含 pAdeasy-1 的 BJ5183 菌, 大量扩增后制备含 pAdeasy-1 的超感受态 BJ5183。pShuttle-EGFP-hSDF-1 α 经 *Pme* I 酶切 24 h 后, 直接用无水乙醇沉淀 DNA, 再用碱性磷酸酶(CIAP) 50 $^{\circ}$ C, 30 min 去磷酸化, 经 7 g/L 低熔点琼脂糖凝胶电泳, 回收线性去磷酸化的 pShuttle-EGFP-hSDF-1 α , 经酚、氯仿抽提后转化含 pAdeasy-1 的超感受态 BJ5183。挑 3 个单克隆菌落, 小量培养, 碱裂解法小量提取质粒, 经 *Pac* I 酶切, 7 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 若出现一大于 23 kb 和 4.5 kb 或 3.0 kb 的特征性条带, 即为阳性质粒。将重组的 pAd-EGFP-hSDF-1 α 在 XL10-gold 中大量扩增。

1.2.5 重组腺病毒的包装、扩增、纯化、滴度测定及鉴定 重组腺病毒质粒 pAd-EGFP-hSDF-1 α 经 *Pac* I 酶切后, 采用脂质体 LipoVec 介导转染 Ad293 细胞。于转染后不同时间用普通倒置相差显微镜和荧光显微镜分别观察细胞的病理变化及是否出现绿色荧光。若出现绿色荧光及细胞变圆, 说明已有病毒包装。当出现 90% 细胞病变时, 将 293 细胞自培养瓶中刮下, -80 $^{\circ}$ C ~ 37 $^{\circ}$ C 反复冻融 3 次裂解细胞, 离心取含病毒的上清, 重新感染 293 细胞, 大量扩增病毒。重组腺病毒的纯化参照王家宁等^[9]的方法。将透析纯化后的腺病毒采用紫外分光光度计进行滴度测定。取纯化后的病毒液 100 μ L, 10 g/L SDS 20 μ L, PBS 880 μ L, 测定病毒基因组 DNA 的 $A_{260\text{ nm}}$ 和 $A_{280\text{ nm}}$, 据此计算病毒的颗粒数和纯度, $1 A_{260\text{ nm}} = 10^{15}$ pfu/L, $\text{pfu/L} = A_{260\text{ nm}} \times \text{dilution} \times 10$, $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}} > 1.3$ 表明病毒纯度较高。重组腺病毒 Ad-EGFP-hSDF-1 α 的 PCR 鉴定: 自病毒上清液中提取重组腺病毒基因组 DNA 作为模板, 扩增目的基因, 若出现 279 bp 的预期片段,

说明携带 hSDF-1 α 的重组腺病毒。

2 结果

2.1 hSDF-1 α cDNA 的扩增 2 g/L 琼脂糖凝胶电泳可见特异性 279 bp 扩增片断(图 1)。

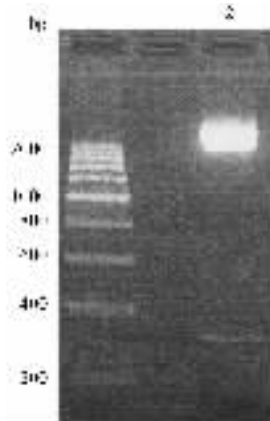


1: 200 bp DNA marker; 2: hSDF-1 α cDNA 扩增产物(279 bp)。

图 1 hSDF-1 α cDNA 扩增产物电泳结果

2.2 pGEM-T-hSDF-1 α 的酶切鉴定及测序结果

pGEM-T-hSDF-1 α 经 *EcoR* V 和 *Xho* I 双酶切 (2 g/L 琼脂糖凝胶电泳可见 279 bp 片断(图 2)), 说明 hSDF-1 α cDNA 已经成功地插入 T 载体上。将构建的 pGEM-T-hSDF-1 α 重组质粒送北京华大生物科技发展有限公司进行测序, 其序列与 hSDF-1 α 基因供应商 Invivogen 公司提供的序列完全一致。



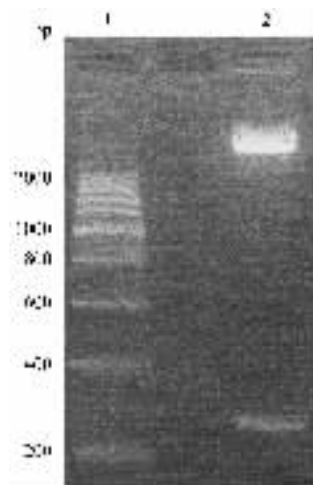
1: 200 bp DNA marker; 2: pGEM-T-hSDF-1 α (*EcoR* V + *Xho* I; 279 bp, 3 kb)。

图 2 pGEM-T-hSDF-1 α 酶切鉴定

2.3 穿梭质粒 pShuttle-EGFP-hSDF-1 α 的鉴定

hSDF-1 α cDNA 自 pGEM-T-hSDF-1 α 中经 *EcoR* V 和 *Xho* I 双酶切, 亚克隆入经同样酶切的穿梭质粒 pShuttle-IRES-HrGFP-2 中, 形成穿梭质粒 pShuttle-

EGFP-SDF-1 α 。经 *EcoR* V 和 *Xho* I 酶切后获得 8.8 kb 和 279 bp 两条带, 证明目的基因已成功插入到穿梭质粒 pShuttle-IRES-HrGFP-2(图 3)。



1: 200 bp DNA marker; 2: pShuttle-EGFP-hSDF-1 α (*EcoR* V + *Xho* I; 279 bp, 8.8 kb)。

图 3 pShuttle-EGFP-hSDF-1 α 的酶切鉴定

2.4 重组腺病毒质粒(pAd-EGFP-hSDF-1 α)的酶切鉴定

pShuttle-EGFP-hSDF-1 α 和 pAdeasy-1 转化 BJ5183 细菌后, 含有重组质粒的细菌可在含卡那霉素的培养基中生长形成克隆。挑取克隆, 少量抽提质粒 DNA。用 *Pac* I 酶切, 重组腺病毒质粒出现一大于 23 kb 和 4.5 kb 的片段, 说明 pAdeasy-1 与 pShuttle-EGFP-hSDF-1 α 在复制起始位点与右臂之间发生了同源重组(图 4)。

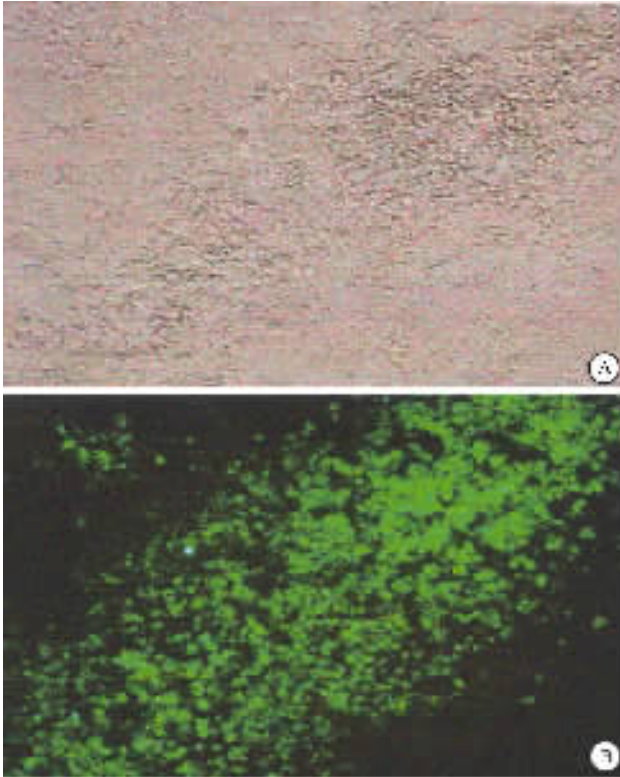


1: 200 bp DNA marker; 2: pAd-EGFP-hSDF-1 α (*Pac* I; 4.5 kb, >23 kb)。

图 4 pAd-EGFP-hSDF-1 α 的酶切鉴定

2.5 pAd-EGFP-hSDF-1 α 转染的 AD293 细胞的荧光显微镜下观察 正常的 AD293 细胞呈多角形,

界限清晰,分布均匀.在 LipoVec 介导的 Pac I 酶切的 pAd-EGFP-hSDF-1 α 转染 AD293 细胞 14 d 后, pAd-EGFP-hSDF-1 α 转染的 AD293 细胞 14 d 后在倒置显微镜下可见细胞肿胀,变圆,聚集成团,呈典型葡萄串样改变等典型的腺病毒感染 AD293 细胞后的病变情况.荧光显微镜镜下观察,可见大量的克隆呈绿色荧光,说明 LipoVec 可有效介导重组病毒质粒的转染,也说明在 AD293 细胞中有重组腺病毒的包装,并能表达 hSDF-1 α (图 5).



A: pAd-EGFP-hSDF-1 α 转染 AD293 细胞 2 wk 时的细胞病变效应; B: pAd-EGFP-hSDF-1 α 转染 AD293 细胞 2 wk 时表达绿色荧光蛋白.

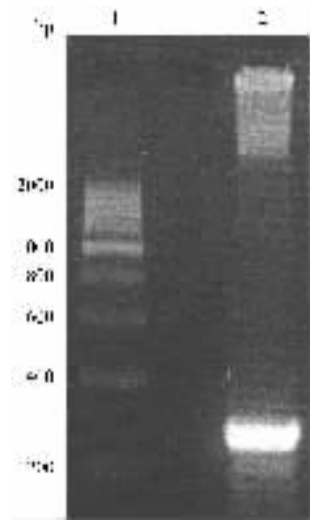
图 5 pAd-EGFP-hSDF-1 α 转染的 AD293 细胞的显微镜观察 $\times 100$

2.6 重组腺病毒滴度测定 重组腺病毒经包装、扩增、纯化后经紫外分光光度计测定,病毒滴度为 4.1×10^{15} pfu/L, $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}} = 1.451 > 1.3$,说明病毒滴度较高,可满足在体基因治疗的需要,且纯度较高.

2.7 重组腺病毒 Ad-EGFP-hSDF-1 α 的 PCR 鉴定 以提取的病毒 DNA 为模板进行 PCR 反应,2 g/L 琼脂糖凝胶电泳,结果出现了 279 bp 的特异性片段,说明病毒 Ad-EGFP-hSDF-1 α 包装成功(图 6).

3 讨论

已知 SDF-1 及其受体 CXCR4 是骨髓源干细胞迁



1: 200 bp DNA marker; 2: Ad-EGFP-hSDF-1 α (279 bp).

图 6 Ad-EGFP-hSDF-1 α 的 PCR 鉴定

移归巢到骨髓、肝脏、脑等组织损伤部位所必需信号分子^[10-11].我们为探索 hSDF-1 α 在动员骨髓源干细胞迁移到心肌梗死部位的作用,急需制备表达 hSDF-1 α 的重组腺病毒.重组腺病毒是基因转移和基因表达的有效工具,腺病毒既可感染静止期细胞又可感染分裂期细胞,并能获得高滴度病毒和高效基因表达,用于基因治疗的腺病毒一般都是 E1 和 E3 区基因的复制缺陷性 2 型或 5 型重组腺病毒,此复制缺陷性病毒的复制、扩增需要 293 细胞,293 细胞是一种转化了 E1 区的人胚肾细胞,能编码腺病毒的 E1 区.在 293 细胞中产生的复制缺陷性腺病毒颗粒能感染许多类型的细胞,并表达所插入的外源基因,但不能在感染的细胞中复制.这种 E1 区缺失的腺病毒既能避免本身对宿主细胞的损害,同时又达到基因治疗的目的.重组腺病毒介导的基因转移并不插入到宿主细胞染色体中,故无激活致癌基因或插入突变的危险等优点.腺病毒是目前基因治疗和临床研究中使用较广泛的载体之一^[12-13].

我们用 PCR 的方法获得 hSDF-1 α 的 cDNA 片段,并在它两端添加匹配的限制性内切酶位点以便于 DNA 重组的操作.由于 Taq 酶在 PCR 时有一定的误掺率,本实验目的基因扩增中我们采用了高保真的 pfu 酶代替 Taq 酶进行 PCR 扩增,保证了 PCR 扩增的 hSDF-1 α cDNA 片段的准确性,在 PCR 完成后利用 Taq 酶非模板依赖性末端转移酶特性对 PCR 产物进行加“A”反应,选用了 3'末端带单个“T”的 T 载体作为中间载体,利用了 T/A 高效互补,成功构建了含两端带有特定酶切位点的 hSDF-1 α cDNA 的重组质粒 pGEM-T-hSDF-1 α .

我们构建腺病毒载体的穿梭质粒 pShuttle-IRES-HrGFP-2 中构建元件已插入增强性 GFP 表达盒,因此重组腺病毒载体在 293 细胞的包装过程中很容易通过荧光显微镜观察是否已包装入细胞,在重组腺病毒介导 hSDF-1 α 基因感染细胞时,易观察到 hSDF-1 α 基因是否已转入细胞,及是否表达 hSDF-1 α 。

重组腺病毒制备的技术关键是对同源重组和对重组体的筛选、鉴定^[9]。传统的细胞内同源重组法是将腺病毒骨架质粒和携带目的基因的穿梭质粒共转染 293 细胞,这一方法要求两种质粒同时转移至同一 293 细胞中,并在该细胞中发生同源重组。由于两种质粒转染同一 293 细胞的可能性很小,发生同源重组的机率就更小。提高同源重组率是制备腺病毒一直致力要解决的首要问题。本研究我们采用了细菌内同源重组法快速构建重组腺病毒质粒,与传统方法不同的是两种质粒的转染和同源重组都是在 BJ5183 菌中完成^[14]。由于质粒转化细菌的效率极高,细菌繁殖速度快,BJ5183 菌中的 RecA 具有很强的重组活性,因此细菌中同源重组法克服了细胞内质粒共转染效率低和同源重组率低的缺点。本研究我们采用 pAdEasy-1 先转入 BJ5183 菌中,制备含 pAdEasy-1 的感受态 BJ5183,再将线性化的 pShuttle-EGFP-hSDF-1 α 转入该菌,同源重组后 pShuttle-EGFP-hSDF-1 α 的耐卡那抗性基因被重组进去,而 pAdEasy-1 的耐氨苄抗性被重组除去,发生了同源重组的细菌在 Kan + 平板上能生长,而未发生同源重组的细菌不能在 Kan + 平板上生长。成功重组的腺病毒质粒在 XL10-gold 菌中扩增、提取后,用 Pac I 酶切,除去 Kan 和 Ori 载体构件,暴露反向末端重复序列,回收目的片断,用阳离子脂质体 LipoVec 转染 AD293 细胞,包装产生重组腺病毒 Ad-EGFP-hSDF-1 α ,这样就省却了细胞内同源重组法对所产生的重组腺病毒必须进行的多轮费时、费力的筛选鉴定,大大缩短了实验周期,且显著提高了成功率。

重组腺病毒 Ad-EGFP-hSDF-1 α 经浓缩纯化后,滴度达到了 4.1×10^{15} pfu/L, $A_{260}/A_{280\text{nm}} > 1.3$ 。说明采用此方法制备的重组腺病毒,滴度较高,纯度较好,可满足在体基因转移的需要。为今后 hSDF-1 α 基因在组织损伤部位高表达动员骨髓源干细胞治疗心肌梗死等人类疾病的研究奠定了基础。

【参考文献】

- [1] Kucia M, Jankowski K, Reza R, et al. CXCR4-SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion [J]. J Mol Biol, 2004, 35(3):233-245.
- [2] Aiuti A, Webb IJ, Bleul C, et al. The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34⁺ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34⁺ progenitors to peripheral blood [J]. J Exp Med, 1997, 185(1):111-120.
- [3] 唐俊明, 谢祁阳. 干细胞迁移到心肌梗死区域的调控机制 [J]. 心脏杂志, 2004, 16(4):381-384.
- [4] Hattori K, Heissig B, Tashiro K, et al. Plasma elevation of stromal cell-derived factor-1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells [J]. Blood, 2001, 97(11):3354-3360.
- [5] Petit I, Szyper-Kravitz M, Nagler A, et al. G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4 [J]. Nat Immunol, 2002, 3(7):687-694.
- [6] Askari AT, Unzek S, Popovic ZB, et al. Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy [J]. Lancet, 2003, 362(9385):697-703.
- [7] 丁鹏, 王家宁, 黄永章, 等. PEP-1 肽介导人 Cu, Zn-SOD 转入人脐静脉内皮细胞 [J]. 第四军医大学学报, 2006, 29(9):855-859.
- [8] 董晓, 王家宁, 黄永章, 等. pET15b-EGFP 原核表达载体构建及其表达和纯化 [J]. 南阳医学院学报, 2005, 24(6):321-325.
- [9] 王家宁, 黄永章, 孔震, 等. 细菌内同源重组快速构建和制备表达 β -半乳糖苷酶的重组腺病毒 [J]. 南阳医学院学报, 2004, 23(1):1-6.
- [10] Wojakowski W, Tendera M, Michalowska A, et al. Mobilization of CD34/CXCR4⁺, CD34/CD117⁺, c-met⁺ stem cells, and mononuclear cells expressing early cardiac, muscle, and endothelial markers into peripheral blood in patients with acute myocardial infarction [J]. Circulation, 2004, 110(20):3213-3220.
- [11] Kollet O, Shvitiel S, Chen YQ, et al. HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34⁺ stem cell recruitment to the liver [J]. J Clin Invest, 2003, 112(2):160-169.
- [12] Shimada H, Matsubara H, Shiratori T, et al. Phase I/II adenoviral p53 gene therapy for chemo radiation resistant advanced esophageal squamous cell carcinoma [J]. Cancer Sci, 2006, 97(6):554-561.
- [13] 葛永贵, 王家宁, 张群林, 等. 经皮冠脉内腺病毒载体介导的血管内皮生长因子基因转移治疗严重冠心病 [J]. 南阳医学院学报, 2000, 19(4):197-201.
- [14] He TC, Zhou S, Da Costa L T, et al. A simplified system for generating recombinant adenoviruses [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(5):2509-2514.