

基因调控

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000151

杆状病毒介导肝生长因子在兔骨髓间充质干细胞中的调控表达

郑超¹, 戴闽¹, 潘志敏¹, 郭菲², 涂以济³, 程细高³, 唐丽梅⁴

(1. 南昌大学第一附属医院骨科, 南昌 330006; 2. 南昌大学第一附属医院烧伤研究所, 南昌 330006;

3. 南昌大学第二附属医院骨科, 南昌 330006; 4. 中国中医科学院针灸研究所, 北京 100007)

【摘要】目的:建立转染高效可控的携带肝生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)为目的基因的重组杆状病毒 vAc^{rTA2s-P_{hgh}-HGF}, 并探寻其在转染骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BM-MSCs)后的最佳诱导浓度。**方法:**用转基因的方法构建重组杆状病毒 vAc^{rTA2s-P_{hgh}-HGF}, 随后转染 BM-MSCs, 用 ELISA 和 Western blot 检测不同浓度强力霉素(doxycycline, DOX)诱导体外培养兔 BM-MSCs 分泌的 HGF 浓度。**结果:**构建了高效可控重组杆状病毒 vAc^{rTA2s-P_{hgh}-HGF}, 并且成功转染兔 BM-MSCs, 用系列浓度 DOX 诱导时 ELISA 和 Western blot 均检测到 BM-MSCs 中 HGF 的表达有 DOX 诱导剂量依赖关系并且连续 7 d 持续表达, 且实验组的 HGF 的表达量明显高于对照组($P < 0.001$)。**结论:**成功构建一次性转染、高效可控的重组杆状病毒 vAc^{rTA2s-P_{hgh}-HGF}, 并实现对 HGF 表达的调控, 当 DOX 诱导浓度为 1 $\mu\text{g/ml}$ 时为其体外最佳诱导浓度。

【关键词】骨髓间充质干细胞; 杆状病毒; 转染; 肝生长因子; 强力霉素; 调控表达**【中图分类号】**R318.04**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2013-03-01

Controllable HGF expression in bone marrow mesenchymal stem cells through baculovirus system

Zheng Chao¹, Dai Min¹, Pan Zhimin¹, Guo Fei², Tu Yiji³, Cheng Xigao³, Tang Limei⁴

(1. Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Nanchang University;

2. Institute of Burn, the First Affiliated Hospital of Nanchang University;

3. Department of Orthopedics, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University;

4. Institute of Acupuncture, China Academy of Chinese Medical Sciences)

【Abstract】Objective: To construct an efficient and controllable recombinant baculovirus vAc^{rTA2s-P_{hgh}-HGF} and to investigate the optimum**作者介绍:** 郑超, Email: 649090483@qq.com,**研究方向:** 骨与关节。**通信作者:** 程细高, Email: cxgyaf1004@sina.com。**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目 (编号: 81060147)。**优先出版:** <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000151.html>dose of doxycycline (DOX) for the induction of hepatocyte growth factor (HGF) expression in bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs) infected with vAc^{rTA2s-P_{hgh}-HGF}. **Methods:** vAc^{rTA2s-P_{hgh}-HGF} was built by gene recombination. BM-MSCs of New Zealand white rabbits were isolated and cultured by adhe-

mice[J]. FEBS Lett, 2009, 583(12): 2009-2014.

[20] Dey N, Ghosh-Choudhury N, Kasinath BS, et al. TGF β -stimulated microRNA-21 utilizes PTEN to orchestrate AKT/mTORC1 signaling for mesangial cell hypertrophy and matrix expansion[J]. PLoS One, 2012, 7(8): e42316.[21] Meng XM, Huang XR, Chung AC, et al. Smad2 protects against TGF- β /Smad3-mediated renal fibrosis[J]. J Am Soc Nephrol, 2010, 21(9): 1477-1487.

[22] Zhong X, Chung AC, Chen HY, et al. Smad3-Mediated upregulation of miR-21 promotes renal fibrosis[J]. J Am Soc Nephrol, 2011, 22(9): 1668-1681.

[23] Zarjou A, Yang SZ, Abraham E, et al. Identification of a microRNA signature in renal fibrosis: role of miR-21[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2011, 301(4): F793-F801.

[24] Chung AC, Dong Y, Yang WQ, et al. Smad7 suppresses renal fibrosis via altering expression of TGF- β /Smad3-regulated microRNAs

[J]. Mol Ther, 2013, 21(2): 388-398.

[25] Wang G, Kwan BC, Lai FM, et al. Urinary miR-21, miR-29, and miR-93: novel biomarkers of fibrosis[J]. Am J Nephrol, 2012, 36(5): 412-418.

[26] Liu G, Friggeri A, Yang YP, et al. miR-21 mediates fibrogenic activation of pulmonary fibroblasts and lung fibrosis[J]. J Exp Med, 2010, 207(8): 1589-1597.

[27] Wang J, Sun SB, Sun TW. Expression and possible function of microRNA-21 in cirrhotic liver tissues[J]. Chinese Journal of Hepatology, 2009, 17(1): 74-75.

[28] Marquez RT, Bandyopadhyay S, Wendlandt EB, et al. Correlation between microRNA expression levels and clinical parameters associated with chronic hepatitis C viral infection in humans[J]. Lab Invest, 2010, 90(12): 1727-1736.

(责任编辑: 唐秋姗)

sion method and then were infected with $vAc^{rtTA2s-Ptight-HGF}$. Concentration of HGF secreted by infected rabbit BM-MSCs was verified by ELISA and Western blot with different induction doses of DOX. **Results:** An efficient and controllable recombinant baculovirus $vAc^{rtTA2s-Ptight-HGF}$ was successfully constructed by gene recombination and rabbit BM-MSCs was successfully infected. Different levels of HGF expression under different doses of DOX were quantitatively verified by ELISA and Western blot. Expression of HGF was in dose-dependent relationship with DOX doses and was consistently lasted for 7 d. Expression of HGF was higher in experiment group than in control group ($P < 0.001$). **Conclusions:** BM-MSCs/ $vAc^{rtTA2s-Ptight-HGF}$ demonstrates higher HGF expression and the optimum dose of DOX to induce HGF expression in infected rabbit BM-MSCs was 1 $\mu\text{g/ml}$.

【Key words】bone marrow mesenchymal stem cell; baculovirus; transfection; hepatocyte growth factor; deoxycycline; controllable expression

由于酗酒和激素滥用,股骨头坏死(osteonecrosis of the femoral head, ONFH)发病率近年来逐渐升高^[1-2]。研究表明,骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BM-MSCs)移植对 ONFH 具有一定的修复作用,但存在坏死区血供差不利于 BM-MSCs 存活等问题^[3]。如何改善缺血坏死区微环境以提高 BM-MSCs 对 ONFH 的修复作用是该研究领域亟待解决的问题。有研究显示肝生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)可在缺氧条件下有效阻止 BM-MSCs 凋亡、促血管生成及诱导其定向分化^[4-5],但 HGF 过量表达存在诱发肉瘤等风险^[6-7]。为有效改善缺血坏死区微环境以促进 BM-MSCs 对 ONFH 的修复,降低风险,拟构建表达 HGF 的四环素调控重组杆状病毒,对 BM-MSCs 进行基因修饰,以达到可通过外源性给药有效调控 HGF 释放的目的,为后续的体内研究做准备。

1 材料和方法

1.1 实验材料

胎牛血清, Hyclone F-12 培养基, 强力霉素(doxycycline, DOX), Lipofectin 2000, *Xho* I 酶, *Hind* III 酶, *Bam* H I 酶, 凝胶回收试剂盒, 杆状病毒表达系统, sf9 细胞, 牛肠碱性磷酸酶(CIAP), hHGF kit, 抗 hHGF 抗体, 过氧化物酶标记的第二抗体等购于 Sigma 公司; pTet-on advanced system 为 R&D 公司产品; 新西兰大白兔购自南昌大学动科部, 培养瓶、离心管及培养皿购于美国 Corning 公司。

按文献常规进行兔 BM-MSCs 的培养和提取^[8]。

1.2 重组 Bacmid 的构建

购买的人 HGF 基因(NM000601.4, 2 187 bp), 设计引物 HGF-F: 5'-AGGATCCATGTGGGTGACCAAACTCC-3' (划线处为 *Bam* H I 酶切位点), HGF-R: 5'-GTCTAGACTATGACTGTGGTACCTTATA-3' (划线处为 *Xba* I 酶切位点)。PCR 扩增后凝胶电泳鉴定。PCR 产物胶回收目的片段连接于

PMD19-T 合成重组质粒 PMD19-HGF。随后转化 DH5a, 涂 LB+Amp 平板, 挑取阳性菌落, 提取质粒用 *Bam* H I 和 *Xba* I 双酶切鉴定。目的基因片段从 T 载体酶切回收后, 连接 pTRE-tight 构建重组质粒 pTRE-HGF, 转化 DH5a, 涂 LB+Amp 平板, 挑取阳性菌落, 提取质粒酶切鉴定(*Bam* H I + *Xba* I)。pTet-on Advanced 用 *Xho* I 和 *Hind* III 酶切后回收约 2 kb 的部分连接经同样酶切的 pFastBac1 形成重组质粒 pBac-rtTA2s, 转化 DH5a, 鉴定出阳性克隆。将重组质粒 pBac-rtTA2s 用 *Xho* I 单酶切, 牛肠碱性磷酸酶去磷酸化, 胶回收纯化。重组质粒 pTRE-HGF 用 *Xho* I 单酶切。选用不完全酶切, 回收目的条带大小为 2 800 bp 左右。将目的片段回收后连接 pBac-rtTA2s, 转化 DH5a, 提取质粒 *Xho* I 酶切鉴定, 鉴定正确命名为 pBac-rtTA2s-Ptight-HGF。同时用 *Bam* H I 鉴定方向, 选取目的基因与 Tet-on 插入方向相反的克隆。将鉴定正确的重组供体质粒 pBac-rtTA2s-Ptight-HGF 取 3 μl 转化含有 AcM-NPV Bacmid 和 helper 质粒的 DH10Bac 感受态细胞, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 4 h 后取 100 μl 涂布于含有 IPTG、X-Gal、7 $\mu\text{g/ml}$ 庆大霉素、50 $\mu\text{g/ml}$ 卡那霉素和 10 $\mu\text{g/ml}$ 四环素的 LB 固体培养基上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 20 h。挑取白色单菌落扩大培养后提取 Bacmid DNA。取 1 μl Bacmid DNA 为模板, PCR 鉴定。

1.3 重组杆状病毒 $vAc^{rtTA2s-Ptight-HGF}$ 的扩增与纯化

鉴定正确的 Bacmid 转染昆虫细胞 Sf9, 5 d 后收取病毒, 再感染细胞, 再收集获取重给杆状病毒。转染方法如下: 接种 sf9 细胞在 35 mm 小皿中, 待细胞贴壁后准备转染。具体步骤如下: 取 0.5 μg 质粒 DNA 用无血清 Grace 培养基稀释至总体积为 50 μl , 轻弹混匀; 另取 5 μl Lipofectin 阳离子转染试剂也用无血清 Grace 培养基稀释至总体积为 50 μl , 轻弹混匀, 将质粒 DNA 加到脂质体里, 室温放置 30 min, 并不时轻弹混匀, 再加入 0.9 ml 无血清培养基, 混匀。细胞用无血清 Grace 培养基漂洗 2 次, 每孔加入 1 ml 转染混合物。27 $^{\circ}\text{C}$ 温育 4 h 后除去转染混合物, 加入 2 ml 含 10% 胎牛血清的 Grace 培养基继续培养。

1.4 重组杆状病毒 $vAc^{rtTA2s-Ptight-HGF}$ 转染兔 BM-MSCs

4~6 代兔 BM-MSCs 用于病毒转导实验。用细胞计数法将兔 BM-MSCs 8000 接种于 96 孔板中培养 24 h, 贴壁后, 生长至 80% 左右, 吸取培养基, 用 PBS 洗 2 遍。依据细胞数量

加入重组杆状病毒原液,使其感染复数(multiplicity of infection, MOI)值为 200,移至 25 ℃ 恒温振荡器内孵育 4 h。

1.5 BM-MSCs 的诱导

4 h 后吸去重组杆状病毒原液。对照组和实验组一共取 36 孔,对照组 6 孔,实验组 30 孔。对照组为转染后 BM-MSCs 加入 0 ng/ml DOX 200 μ l HycloneF-12 培养基(含 8%FBS)。实验组转染后的 BM-MSCs 加入含 DOX 分别为 0、10、100、500、1 000、1 200 ng/ml 的 200 μ l 的 HycloneF-12 培养基(含 8%FBS),分别取 6 孔,后置于 37 ℃,5%CO₂ 孵箱中培养。72 h 后取其上清液样本保存。再取 30 孔转染后的 BM-MSCs 加入含 DOX 500 ng/ml Hyclone F-12 培养基(含 8%FBS),分别在第 1、2、3、5、7 天取上清液样本保存,取完样本后各加入含 8%FBS 的 Hyclone F-12 培养基后置于细胞培养箱继续培养。用 ELISA 和 Western blot 检测 HGF 的表达量。

1.6 统计学分析

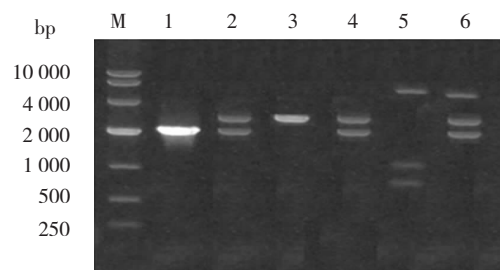
统计学处理采用 SPSS 17.0 统计软件,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析和 Dunnett-*t* 检验进行统计分析,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 成功构建重组杆状病毒 vAc^{rtTA2s}-Ptight-HGF

以购买的人 HGF 为模板,PCR 扩增后凝胶电泳检测,可见 2 000 bp 左右明亮特异的条带(图 1),说明成功获取人 HGF 基因片段。PCR 产物连接 PMD19-T,转化大肠杆菌 DH5a 感受态细胞,挑取阳性菌落,双酶切鉴定,可见 2 000 bp 和 2 700 bp 左右明亮特异的条带(图 1),表明 HGF 克隆成功,目的基因片段从 T 载体酶切回收后,连接 pTRE-tight 合成重组质粒 Ptight-HGF,转化 DH5a,提取质粒酶切鉴定,可见 2 条 2 000 bp 左右明亮特异的条带,与 pTRE-tight 用同样双酶切比较,可知道 HGF 克隆入 pTRE-tight 成功(图 1),pTet-on Advanced 用 *Xho* I 和 *Hind* III 酶切后产生 2 部分(5.1 kb+2 kb),回收约 2 kb 的部分连接经同样酶切的 pFastBac1,转化 DH5a,提取质粒酶切鉴定表明成功获取 rtTA2s-M2 序列。重组质粒 pTRE-HGF 用 *Xho* I 单酶切。HGF 基因中含有 2 个 *Xho* I 酶切位点,所以选用不完全酶切,获得目的筛大小为 2 800 bp 左右(2 190 bp+600 bp)。回收的 2 800 bp 左右条带内不仅包括 HGF 片段,还包括 2 种其他的片段,因此在

连接后要筛选大量的阳性克隆,酶切鉴定。将目的片段回收后连接经 *Xho* I 单酶切 pBac-rtTA2s,转化 DH5a,提取质粒 *Xho* I 酶切鉴定,同时用 *Bam*HI 鉴定方向(图 1),表明重组杆状病毒供体质粒 pBac-rtTA2s-Ptight-HGF 构建成功。pBac-rtTA2s-Ptight-HGF 转化含有 AcMNPV Bacmid 和 helper 质粒的 DH10Bac 感受态细胞,在上述条件下成功提取,挑取白色单菌落扩大培养后提取 Bacmid DNA。取 1 μ l Bacmid DNA 为模板,PCR 鉴定,表明成功获得重组杆状病毒供体质粒。



M. DL10 000 Marker; 1. HGF 基因的扩增产物; 2. pMD-HGF 的酶切产物(*Bam*HI + *Xba*I); 3. pTRE-tight 的酶切产物(*Bam*HI + *Xba*I); 4. pTRE-HGF 的酶切产物(*Bam*HI + *Xba*I); 5. 用限制性内切酶 *Xho*I 酶切 Donor plasmid pBac-rtTA2s-Ptight-HGF 的产物; 6. 用限制性内切酶 *Bam*HI 酶切 Donor plasmid pBac-rtTA2s-Ptight-HGF 的产物

图 1 PCR 产物凝胶电泳分析鉴定

Fig.1 Identification of PCR products

2.2 成功实现 HGF 在兔 BM-MSCs 中的调控表达

ELISA 定量检测不同浓度 DOX 诱导时 HGF 的表达量。对照组中只含有 200 μ l 8%FBS 的 Hyclone F-12 培养基(0 pg/ml, 即空白对照),实验组为 200 μ l 8%FBS 的 Hyclone F-12 培养基中 DOX 的浓度为 0、10、100、500、1 000、1 200 ng/ml 5 个亚组,72 h 后取上清液 ELISA 测定 HGF 的表达量(表 1),Western blot 结果与 ELISA 一致,并且当 DOX 诱导剂量为 1 000 ng/ml 时明显高于对照组($F=1\ 385.279$; $P=0.001$)(图 2),并取 200 μ l 8%FBS 的 HycloneF-12 培养基含 DOX 为 500 ng/ml 组 ELISA 和 Western blot 连续 7 d 检测 HGF 表达量(表 2),发现 HGF 在兔 BM-MSCs 中持续表达,在第 3 天 HGF 的表达量达到高峰,明显高于第 1 天 HGF 的表达量($F=1\ 254.358$; $P=0.001$)(图 3)。

表 1 系列浓度 DOX 诱导 HGF 的表达量(72 h)

Tab.1 Different concentrations of DOX-induced HGF expression (72 h)

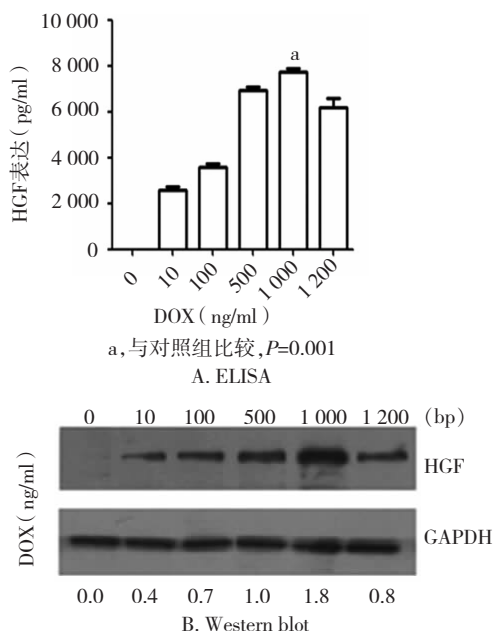
组别	重复次数(次)	DOX (ng/ml)	72 h HGF 的表达量 (pg/ml)	t_p	P 值
对照组	6	0	0		
实验组	6	10	2 586.75 $\pm$ 51.91	49.83	0.001
	6	100	3 605.58 $\pm$ 52.87	66.93	0.001
	6	500	6 952.00 $\pm$ 46.78	140.91	0.001
	6	1 000	7 717.53 $\pm$ 69.35	111.31	0.001
	6	1 200	6 176.25 $\pm$ 159.77	38.66	0.001

表 2 HGF 的持续表达 (DOX:500 ng/ml)

Tab.2 Consistent expression of HGF (DOX:500 ng/ml)

时间 (d)	DOX (ng/ml)	重复次 数(次)	HGF的表达量 (pg/ml)	t_0	P
1	500	6	1 266 ± 354		
2	500	6	5 767 ± 270		
3	500	6	6 584 ± 381 ^a	9.68	0.001
5	500	6	5 271 ± 524		
7	500	6	4 688 ± 368		

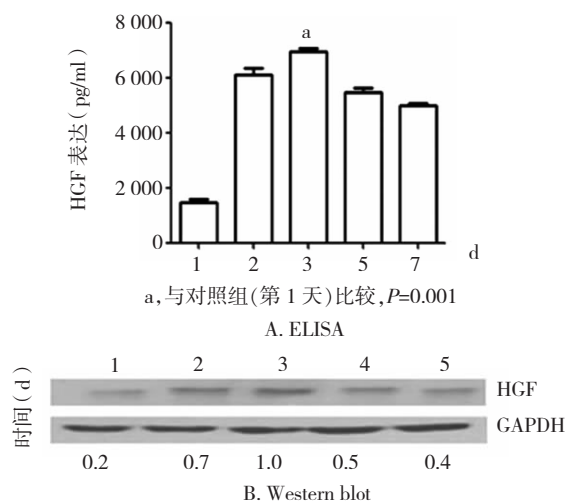
注:a,与第1天比



A. HGF 的表达量与 DOX 有明显的剂量依赖关系,当 DOX 的诱导剂量为 1 000 ng/ml 时 HGF 的表达量明显高于对照组;B. 如图所示: Western blot 检测的结果与 ELISA 一致

图 2 DOX 诱导 HGF 在兔 BM-MSCs 的表达检测

Fig.2 DOX-induced HGF expression in BM-MSCs



A. HGF 连续 7 d 持续表达,第 3 天 HGF 的表达量明显高于其它时间; B. Western blot 的结果支持 ELISA 测定的结论,HGF 的表达有时间依赖关系,在转染后的第 3 天,表达量达到最大值,然后表达逐渐减弱

图 3 DOX 诱导 Hgf 的持续表达

Fig.3 Consistent expression of DOX induced HGF

3 讨论

ONFH 是一种 BM-MSCs 疾病,该疾病可最终导致 ONFH 并须行关节置换治疗。研究表明,在 ONFH 早期,BM-MSCs 在坏死区的植入能够安全有效地治疗该疾病^[9-10],还有研究得出经 HGF 修饰的 BM-MSCs 能够增强坏死区域修复,获得满意的疗效^[11-12]。然而,Ramirez 等^[12]人研究发现 HGF 的过度表达与这些疾病有关,并且发现 HGF/SF 受体与乳头状甲状腺癌的转移与复发有关。Maier 等^[13]在 Kaposi's 肉瘤患者样本中检测发现 HGF 的持续高表达。Cortner 等^[7]研究证实高水平的间充质细胞分泌 HGF/SF 刺激肉瘤的形成与转移。综合考虑上述因素,创造性地将真核基因表达调控系统应用于调控 HGF 在 BM-MSCs 的表达,从而实现 HGF 在 BM-MSCs 按照研究的要求精确表达,这将提高 HGF 修饰的 BM-MSCs 治疗 ONFH 的疗效,并且避免其副作用的发生。寻找合适的携带 HGF 基因的载体是解决问题的关键。在众多载体中,逆转录病毒、慢病毒、腺病毒、腺相关病毒是最常用的几种载体^[14-16]。然而它们却有各自的缺陷,如逆转录病毒及慢病毒随机插入目的细胞基因组可能会导致靶细胞基因组表达的改变及产生致癌性,腺病毒及腺相关病毒载体容量有限等^[17]。杆状病毒表达载体具有强大表达外源蛋白的作用,本研究选择的苜蓿银纹夜蛾杆状病毒是研究和应用最为广泛的杆状病毒表达载体,因其具有较大的外源基因载体容量和极高的生物安全性^[18]。杆状病毒作为一种新型的基因载体有很多优点并且可以转染多种哺乳动物细胞的 BM-MSCs,例如:鼠、猪、恒河猴,但是转染效率有很大的不同^[19-20],Ho 等^[20]研究发现重组杆状病毒可以有效转染人的 BM-MSCs,转染效率高并且对细胞活性、增殖、分化能力没有影响。本研究设计通过重组杆状病毒 vAc^{rtTA2s-P_hgH}-HGF 以 MOI 值为 200 vector genomes/cell 转染入 BM-MSCs,成功检测到 HGF 的调控表达。结果研究表明,杆状病毒可以高效地转染 BM-MSCs,并且外源基因可高效表达。这表明杆状病毒为载体携带外源基因和基因表达调控系统转染 BM-MSCs 实现高效调控 HGF 在 BM-MSCs 中的表达是可行,为其后续体内实验治疗兔 ONFH 模型奠定了基础。本研究中,采用四环素基因调控系统调节质粒调控 HGF 在 BM-MSCs 的表达,该系统高效无毒,具有严密的开、关功能。在 DOX 存在时,可诱导启动子下游的目的基因,而

当 DOX 在系统中去除时,目的基因的转录即行停止^[22]。重组杆状病毒 vAc^{rtTA2s-Pighd-HGF} 转染兔 RM-MSCs, HGF 的表达量实验组明显高于对照组,表明 HGF 的表达成功受四环素基因调控系统调控。没有 DOX 诱导时,没有检测到 HGF 的表达,随着 DOX 浓度的增加,HGF 的表达量明显升高,当 DOX 浓度为 1 000 ng/ml 时,HGF 的表达量达到顶峰,在加入 DOX 诱导后,连续 7 d 检测 HGF 的表达量,发现 HGF 的表达在诱导后持续升高,约 72 h 达到顶峰,这与 Aloia 等研究结果一致^[22-23],并且第 7 天 HGF 的表达量为 $(4\,688 \pm 368)$ pg/ml,表明 HGF 在诱导表达可持续 1 周长的时间。由此得出结论:通过杆状病毒携带基因表达调控系统实现 HGF 在 BM-MSCs 的可调控表达是可行的,这为干细胞治疗疾病提供了新的方式。

参 考 文 献

- [1] Kaushik AP, Das A, Cui Q. Osteonecrosis of the femoral head: An update in year 2012[J]. World Journal of Orthopedics, 2012, 3(5): 49-57.
- [2] Boss JH, Mishevich I. Osteonecrosis of the femoral head of laboratory animals; the lessons learned from a comparative study of osteonecrosis in man and experimental animals[J]. Vet Pathol, 2003, 40(4): 345-354.
- [3] Liu BY, Zhao DW. Treatment for osteonecrosis of femoral head by hVEGF-165 gene modified marrow stromal stem cells under arthroscope[J]. Chinese Medical Journal, 2008, 9(37): 2629-2633.
- [4] Yuan B, Zhang Y, Zhao Z, et al. Treatment of chronic myocardial ischemia by adenovirus-mediated hepatocyte growth factor gene transfer in minipigs[J]. Sci China C Life Sci, 2008, 51(6): 537-543.
- [5] Vogel S, Trapp T, Börger V, et al. Hepatocyte growth factor-mediated attraction of mesenchymal stem cells for apoptotic neuronal and cardiomyocytic cells[J]. Cell Mol Life Sci, 2010, 67(2): 295-303.
- [6] Maier JA, Mariotti M, Albini A, et al. Over-expression of hepatocyte growth factor in human Kaposi's sarcoma[J]. Int J Cancer, 1996, 65(2): 168-172.
- [7] Cortner J, Vande Woude GF, Rong S. The Met-HGF/SF autocrine signaling mechanism is involved in sarcomagenesis[J]. EXS, 1995, 74: 89-121.
- [8] 徐青镭, 吴海山, 周维江. 兔骨髓间充质干细胞的提取和体外培养[J]. 第二军医大学学报, 2000, 21(3): 242-245.
- [8] Gangji V, Hauzeur JP. Treatment of osteonecrosis of the femoral head with implantation of autologous bone-marrow cells. Surgical technique[J]. J Bone Joint Surg Am, 2005, 87(s1): 106-112.
- [9] Zhao D, Cui D, Wang B, et al. Treatment of early stage osteonecrosis of the femoral head with autologous implantation of bone marrow-derived and cultured mesenchymal stem cells[J]. Bone, 2012, 50(1): 325-330.
- [10] Wen Q, Ma L, Chen YP, et al. Treatment of avascular necrosis of the femoral head by hepatocyte growth factor-transgenic bone marrow stromal stem cells[J]. Gene Ther, 2008, 15(23): 1523-1535.
- [11] Wen Q, Jin D, Zhou CY, et al. HGF-transgenic MSCs can improve the effects of tissue self-repair in a rabbit model of traumatic osteonecrosis of the femoral head[J]. PLoS one, 2012, 7(5): e37503.
- [12] Ramirez R, Hsu D, Patel A, et al. Over-expression of hepatocyte growth factor/scatter factor(HGF/SF) and the HGF/SF receptor(cMET) are associated with a high risk of metastasis and recurrence for children and young adults with papillary thyroid carcinoma[J]. Clin Endocrinol (Oxf), 2000, 53(5): 635-644.
- [13] Maier JA, Mariotti M, Albini A, et al. Over-expression of hepatocyte growth factor in human Kaposi's sarcoma[J]. Int J Cancer, 1996, 65(2): 168-172.
- [14] Morita T, Tanimura A, Shitara A, et al. Expression of functional Stim1-mKO1 in rat submandibular acinar cells by retrograde ductal injection of an adenoviral vector[J]. Arch Oral Biol, 2011, 56(11): 1356-1365.
- [15] Valtink M, Knels L, Stanke N, et al. Overexpression of human HMW FGF-2 but not LMW FGF-2 reduces the cytotoxic effect of lentiviral gene transfer in human corneal endothelial cells[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012, 53(6): 3207-3214.
- [16] von Werder A, Seidler B, Schmid RM, et al. Production of avian retroviruses and tissue-specific somatic retroviral gene transfer in vivo using the RCAS/TVA system[J]. Nat Protoc, 2012, 7(6): 1167-1183.
- [17] Liu ZS, Zhang C, Lu XL, et al. Transduction of various mammalian bone marrow-derived mesenchymal stem cells by baculovirus[J]. Acta Physiologica Sinica, 2008, 60(3): 431-436.
- [18] Sandig V, Hofmann C, Steinert S, et al. Gene transfer into hepatocytes and human liver tissue by baculovirus vectors[J]. Hum Gene Ther, 1996, 7(16): 1937-1945.
- [19] Duisit G, Saleun S, Douthe S, et al. Baculovirus vector requires electrostatic interactions including heparan sulfate for efficient gene transfer in mammalian cells[J]. J Gene Med, 1999, 1(2): 93-102.
- [20] Ho YC, Chung YC, Hwang SM, et al. Transgene expression and differentiation of baculovirus-transduced human mesenchymal stem cells[J]. J Gene Med, 2005, 7(7): 860-868.
- [21] Urlinger S, Baron U, Thellmann M, et al. Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators; novel mutations yield expanded range and sensitivity[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(14): 7963-7968.
- [22] Aloia AL, Glatz RV, McMurchie EJ, et al. GPCR expression using baculovirus-infected Sf9 cells[J]. Methods Mol Biol, 2009, 552(10): 115-129.
- [23] Sriram S, Palhan VB, Gopinathan KP. Heterologous promoter recognition leading to high-level expression of cloned foreign genes in Bombyx mori cell lines and larvae[J]. Gene, 1997, 190(1): 181-189.

(责任编辑:冉明会)