

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.01455

转染绿色荧光蛋白-胰岛素融合基因的小鼠骨髓间充质干细胞移植治疗糖尿病小鼠

范向军, 周元, 朱铭岩, 王志伟*

南通大学附属医院普通外科, 南通 226001

[摘要] **目的:** 构建含增强绿色荧光蛋白(EGFP)及胰岛素融合基因的重组质粒, 转染小鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs), 观察转染融合基因后 BMSCs 移植治疗糖尿病模型小鼠的治疗效果。 **方法:** 应用重叠延伸 PCR 技术合成 insulin-IRES-EGFP 和 IRES-EGFP 两段序列, 分别克隆至逆转录病毒载体 pMSCV 中, 经过包装细胞 PT67 的包装后转染小鼠 BMSCs。 荧光显微镜观察转染后 EGFP 的表达; RT-PCR 法检测转染后胰岛素基因的表达。 将转染了两种质粒的 BMSCs 培养后分别植入两组糖尿病模型小鼠体内, 观察各组受体鼠血糖及体质量等指标的变化, 并以正常对照组小鼠作对照。 **结果:** 成功构建重组质粒 pMSCV-insulin-IRES-EGFP、pMSCV-IRES-EGFP; 倒置荧光显微镜下观察到转染后的 BMSCs 发出稳定的绿色荧光信号。 转染了 pMSCV-insulin-IRES-EGFP 的 BMSCs 能稳定表达外源性胰岛素基因, 转染后小鼠血糖明显低于转染 pMSCV-IRES-EGFP 组 ($P < 0.05$), 但仍高于正常对照组 ($P < 0.05$); 转染后 35 d 体质量明显高于转染 pMSCV-IRES-EGFP 组 ($P < 0.05$)。 **结论:** 重构的 insulin-EGFP 载体能够起到良好的示踪作用, 且 EGFP 的表达不影响胰岛素基因的表达; 转染融合基因的小鼠 BMSCs 移植治疗糖尿病小鼠可以部分缓解小鼠糖尿病症状。

[关键词] 骨髓间充质干细胞; 增强绿色荧光蛋白; 转染; 糖尿病; 胰岛素**[中图分类号]** R 587.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)12-1455-05

Transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells harboring fusing gene of enhanced green fluorescent protein and human insulin gene in treatment of diabetic mice

FAN Xiang-jun, ZHOU Yuan, ZHU Ming-yan, WANG Zhi-wei*

Department of General Surgery, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, China

[ABSTRACT] **Objective:** To construct a retroviral vector carrying both enhanced green fluorescent protein(EGFP) and human insulin gene for transfecting the bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs), and to observe the treatment effect of transfected BMSCs after transplanted into diabetes mice. **Methods:** Two gene segments of insulin-IRES-EGFP and IRES-EGFP were obtained by overlap extension PCR technology, and then the 2 segments were cloned into retroviral vector (pMSCV). The vectors were used to transfect BMSCs after packaged with PT67 cells. The expression of EGFP was observed by inverted fluorescence microscope and the expression of insulin gene was examined by RT-PCR in the infected BMSCs. The transfected BMSCs with 2 viruses were transplanted into diabetic mice separately. The blood glucose levels and body weights of mice were examined in 2 groups, and the results were compared with those of normal control group. **Results:** The recombinant retroviral vectors pMSCV-insulin-IRES-EGFP and pMSCV-IRES-EGFP were successfully constructed. The BMSCs infected by both vector stably gave out green fluorescence under microscope; the cells infected with pMSCV-insulin-IRES-EGFP also stably expressed human insulin gene. The blood glucose level of the mice transplanted with BMSCs transfected with pMSCV-insulin-IRES-EGFP was significantly lower than that transplanted with BMSCs transfected with pMSCV-IRES-EGFP ($P < 0.05$), but was still higher than that of the control group ($P < 0.05$). Thirty-five days after transplantation, the body weight of the pMSCV-insulin-IRES-EGFP was significantly higher than that of the pMSCV-IRES-EGFP group ($P < 0.05$). **Conclusion:** The insulin-EGFP recombinant vector can be traced easily, and the expression of EGFP does not affect the expression of insulin. Transplanting the BMSCs transfected with insulin fusion gene can partially relieve the symptoms of the diabetes.

[KEY WORDS] bone marrow mesenchymal stem cells; enhanced green fluorescent protein; transfection; diabetes; insulin

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(12): 1455-1459]

[收稿日期] 2008-07-07**[接受日期]** 2008-08-29**[基金项目]** 江苏省卫生厅资助课题(H200109), 南通市科技局资助课题(S2001). Supported by Public Health Department of Jiangsu Province (H200109) and Science and Technology Bureau of Nantong(S2001).**[作者简介]** 范向军, 硕士, 讲师、主治医师. E-mail: fxj1266@tom.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 0513-85052351, E-mail: wzw3639@sina.com

骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)是细胞移植治疗的理想种子细胞,应用经基因改造并扩增后的 BMSCs 作为替代细胞可以解决移植物受体免疫排斥的问题^[1]。增强型绿色荧光蛋白(EGFP)作为一种新型的报告基因,具有荧光性质稳定、对细胞无毒性、使用方便、可行活细胞实时定位观察等优点^[2]。目前国内外 BMSCs 移植治疗糖尿病的途径主要包括:直接移植法、体外诱导法和基因修饰法等 3 种^[3-5]。其中,直接移植法效果不很稳定;体外诱导法存在受到自身免疫系统特异性攻击的问题;而基因修饰法能较好解决上述问题,是目前细胞移植治疗糖尿病热点。因此,本研究采用重叠延伸 PCR 技术构建重组质粒(pMSCV-insulin-EGFP、pMSCV-EGFP),转染 BMSCs,并利用 EGFP 能稳定发出绿色荧光的特点,观察转染后细胞的生长情况及基因治疗效果。

1 材料和方法

1.1 主要材料及试剂 PCR 反应试剂盒、DNA Marker、质粒小量抽提试剂盒、DNA Ligation Kit Ver. 2.1 连接试剂盒、限制性内切酶(*EcoR* I、*Bgl* II)等均购自大连宝生物公司;胶回收试剂盒购自 Qiagen 公司;pMSCV-insulin 逆转录病毒载体由本实验室构建保存;IRES-EGFP 载体购自北京天泽基

因工程有限公司。

1.2 重组质粒的构建

1.2.1 重叠延伸 PCR 法合成融合基因片段 Insulin-IRES-EGFP 片段合成:PCR 扩增针对 Ivs、insulin、IRES、EGFP 等 4 段序列,分别纯化回收,并进行电泳分析鉴定。针对上述 4 段基因序列设计特异性互补引物(表 1),引物由上海瑞捷生物工程有限公司合成。其中 P2 与 P3, P4 与 P5, P6 与 P7 的序列是互补的。P1 与 P8 包含 *EcoR*I (GAA TTC) 和 *Bgl*II (AGA TCT) 两个酶切位点(表 1,下划线)。以片段 insulin、IRES、Ivs、EGFP 为模板,以 P1、P8 为引物通过重叠延伸 PCR 扩增基因片段 insulin-IRES-EGFP。

Ivs-IRES-EGFP 片段合成:Ivs 的引物为 P1 和 P9, IRES 的引物为 P10 和 P6, EGFP 的引物为 P7 和 P8, P9 与 P10 的序列互补(表 1)。以片段 IRES、Ivs、EGFP 为模板, P1 与 P8 为引物通过重叠延伸 PCR 扩增基因片段 IRES-EGFP。

反应条件:10×Buffer 5 μl, 25 mmol/L MgSO₄ 2 μl, 模板 1~100 ng, P1 20 pmol, P8 20 pmol, dNTPs 终浓度 0.2 mmol/L, *Taq* 酶 1.25~2.5 U, 加 ddH₂O 总反应体积 50 μl。循环条件 95℃ 1 min, 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 2 min, 30 个循环, 最后 72℃ 7 min。取 5 μl 反应产物于 10 g/L 琼脂糖凝胶进行电泳。

表 1 引物序列

Tab 1 Primer sequences

Primer		Base sequences
Ivs	P1	5'-GGC GCC GGA ATT CGT AAG TAT CAA GGT TAC AAG AC-3'
	P2	5'-GAG GCG CAT CCA CAG GGC CAT CCT ATA GTG AGT CGT ATT AAG-3'
Insulin	P3	5'-CTT AAT ACG ACT CAC TAT AGG ATG GCC CTG TGG ATG CGC CTC-3'
	P4	5'-GCC GCC CTA GAT GCA TGC TCG TCA CAA GTT GCA GTA GTT CTC-3'
IRES	P5	5'-GAG AAC TAC TGC AAC TTG TGA CGA GCA TGC ATC TAG GGC GGC-3'
	P6	5'-CTC CTC GCC CTT GCT CAC CAT TTG TGG CAA GCT TAT CAT CG-3'
EGFP	P7	5'-CGA TGA TAA GCT TGC CAC AAA TGG TGA GCA AGG GCG AGG AG-3'
	P8	5'-GTA GAA TTA GAT CTT TAC TTG TAC AGC TCG TCC ATG-3'
Ivs	P9	5'-GCC GCC CTA GAT GCA TGC TCG CCT ATA GTG AGT CGT ATT AAG-3'
IRES	P10	5'-CTT AAT ACG ACT CAC TAT AGG CGA GCA TGC ATC TAG GGC GGC-3'

1.2.2 重组表达载体的构建 DNA 连接试剂盒进行连接,取分别经过限制性内切酶双酶切的线性 pMSCV 0.13 μg (0.03 pmol) 和 insulin-IRES-EGFP 序列 0.072 μg (0.3 pmol) 以及 IRES-EGFP 序列 0.072 μg (0.3 pmol), 溶液体积分别为 8 μl, 加入等体积的含 T4 连接酶的溶液 I, 充分混匀, 16℃ 反应 1 h。将连接后产物转化大肠杆菌 DH5α 扩增培养, 并进行双酶切, 提纯线性载体 pMSCV-insulin-

IRES-EGFP 和 pMSCV-IRES-EGFP。结果进行进一步测序鉴定。

1.3 小鼠 BMSCs 的培养及重组质粒的转染 取小鼠肝素化骨髓, 全贴壁法培养提纯, 取 3 代细胞做流式细胞检测。重组逆转录病毒载体经 PT67 细胞包装后分别转染 BMSCs, 并且在荧光倒置显微镜下观察细胞形态, 拍摄照片。RT-PCR 法检测胰岛素的转录, 设立转染空载体为对照组。

1.4 转染后 BMSCs 移植治疗糖尿病模型小鼠疗效观察

1.4.1 小鼠来源及糖尿病模型的建立 C57BL6J 小鼠由南通大学实验动物中心提供并饲养于实验动物中心的标准化饲养笼中。小鼠禁食 12 h 后称重, 用链脲佐菌素(STZ)140 mg/kg 一次性腹腔内注射并禁食 2 h; 注射后 72 h 剪尾取血, 微量血糖仪检测空腹血糖, 血糖水平超过 13.9 mmol/L 并稳定 3 d 以上为建模成功。

1.4.2 转染后 BMSCs 移植治疗糖尿病疗效观察 取糖尿病模型小鼠 20 只, 雌雄各半, 体质量 20~25 g, 随机分成两组, 一组进行 pMSCV-IRES-EGFP-mBMSCs 移植, 另一组进行 pMSCV-insulin-IRES-EGFP-mBMSCs 移植; 正常健康小鼠 10 只作为正常对照组。用 1% 戊巴比妥钠(50 mg/kg) 腹腔注射麻醉小鼠, 手术进腹, 将 BMSCs 以 PBS 重悬($1 \times 10^6 / 0.1 \text{ ml} \sim 2 \times 10^6 / 0.1 \text{ ml}$), 注入胰腺包膜下; 移植后每天记录各组小鼠的血糖水平、血清胰岛素水平、体质量的变化, 并观察其糖尿病症状的变化。

1.5 统计学处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 13.0 统计软件进行数据处理。

2 结果

2.1 PCR 扩增序列的鉴定结果 经 PCR 扩增的 Ivs、insulin、IRES、EGFP 这 4 段序列上样于低熔点琼脂糖凝胶, 可见第 1~4 泳道分别为 Ivs(230 bp)、insulin(378 bp)、IRES(656 bp)、EGFP(754 bp), 与预期目的基因一致(图 1)。

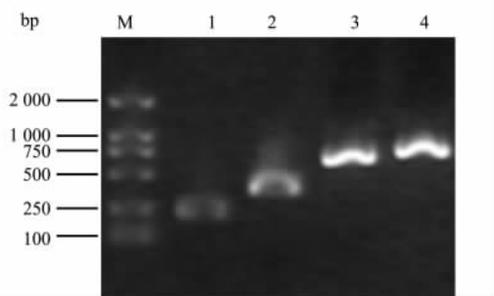


图 1 基因片段的鉴定

Fig 1 Identification of original gene fragment

M: DNA Marker DL2000; 1: PCR for Ivs (230 bp) part of insulin-IRES-EGFP; 2: PCR for insulin (378 bp) part of insulin-IRES-EGFP; 3: PCR for IRES (656 bp) part of insulin-IRES-EGFP; 4: PCR for EGFP (754 bp) part of insulin-IRES-EGFP

2.2 融合基因片段酶切鉴定结果 合成的 Ivs-insulin-IRES-EGFP 序列大小约 1 927 bp, 与理论计算序列一致(图 2A)。合成的 Ivs-IRES-EGFP 序列大小约

1 591 bp, 条带清晰, 与预期序列相符(图 2B)。

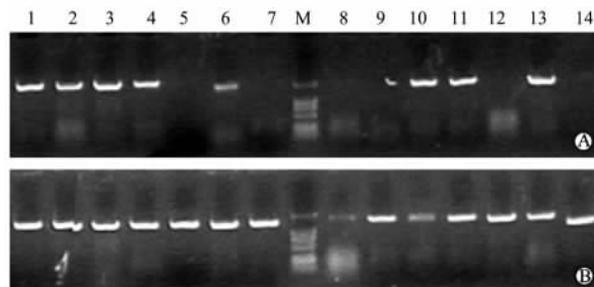


图 2 融合基因片段 insulin-IRES-EGFP(A)、IRES-EGFP(B)的鉴定

Fig 2 Identification of recombinant fragments of insulin-IRES-EGFP(A) and IRES-EGFP(B)

M: DNA Marker DL2000; 1-14: insulin-IRES-EGFP or IRES-EGFP products

2.3 重组表达载体的构建及酶切鉴定结果 对构建的 pMSCV-insulin-IRES-EGFP 和 pMSCV-IRES-EGFP 质粒进行 *EcoRI*、*BglII* 双酶切 PCR 鉴定(图 3), 并被进一步的测序鉴定证实。

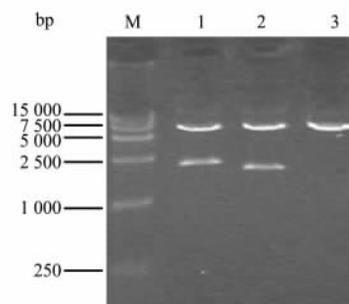


图 3 重组质粒的酶切鉴定

Fig 3 Identification of recombinant plasmid after endonuclease digestion

M: DNA Marker DL2000; 1: pMSCV(6 400 bp)-insulin-IRES-EGFP(1 927 bp); 2: pMSCV(6 400 bp)-IRES-EGFP (1 591 bp); 3: The vacuous pMSCV

2.4 BMSCs 的分离、培养及鉴定结果 流式细胞检测结果发现 CD34 表达率为 7.16%, CD45 表达率为 3.96%, CD29 表达率为 99.2%, Sca-1 表达率为 98.3%, CD44 表达率为 87.1%, CD105 表达率为 42.8%。结果表明培养的细胞高表达 CD44、CD29, 证实本研究所培养的细胞为小鼠 BMSCs。

2.5 重组表达质粒转染小鼠 BMSCs 的结果

2.5.1 荧光显微镜下观察转染后的 BMSCs 绿色荧光显微镜下观察发现, 转染重组表达质粒(pMSCV-insulin-IRES-EGFP/pMSCV-IRES-EGFP) 后的 BMSCs 可以表达增强型绿色荧光蛋白报告基因, 细胞仍然呈极性排列, 都能发出稳定的绿色荧光, 为后续的实验提供了良好的示踪作用(图 4)。

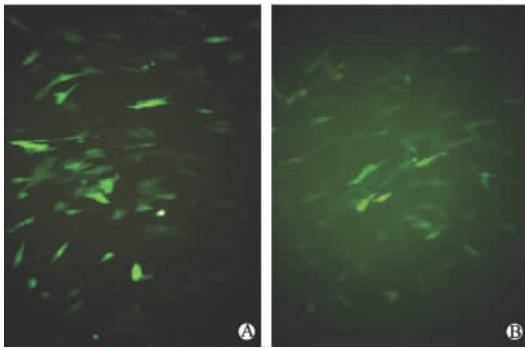


图4 稳定转染后 BMSCs 荧光显微镜下形态

Fig 4 Morphology of BMSCs after transfection under fluorescence microscope

A: Transfected with pMSCV-insulin-IRES-EGFP vector; B: Transfected with pMSCV-IRES-EGFP vector. Original magnification: $\times 200$

2.5.2 RT-PCR 检测外源性胰岛素基因的表达

RT-PCR 电泳结果(图5)表明,转染 pMSCV-insulin-IRES-EGFP 后第 1、7、14、21 日, BMSCs 均有外源性胰岛素 mRNA 的表达,而转染空载体 pMSCV-IRES-EGFP 的细胞则未见胰岛素 mRNA 的表达条带。

2.6 转染后 BMSCs 移植治疗糖尿病小鼠的疗效

小鼠制模前的空腹血糖平均水平为 (4.46 ± 0.85) mmol/L,注射 STZ 后 72 h,各鼠血糖明显升高,均超过 13.9 mmol/L。至第 7 日时(移植当天,即表 2 中的 0 d),与正常对照小鼠比较,糖尿病模型小鼠血糖水平显著升高,达到 (21.45 ± 3.48) mmol/L,具

有统计学差异 ($P < 0.01$),并出现了多饮、多食、多尿,皮毛污秽,消瘦,反应性差等糖尿病症状。

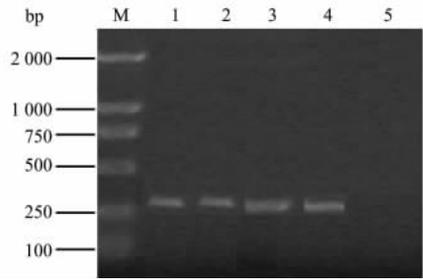


图5 转染重组质粒后 BMSCs 胰岛素基因的表达结果

Fig 5 RT-PCR test results of EGFP-mBMSCs transfected with insulin gene

M: DNA Marker DL2000; 1-4: Insulin mRNA expression was detected in BMSCs on the 1st, 7th, 14th, and 21th day after transfection; 5: Control group (insulin mRNA expression was not detected)

糖尿病模型小鼠移植空质粒转染的 BMSCs 后血糖一直维持高水平;术后 21 d,与空质粒转染 BMSCs 移植组小鼠相比,移植 pMSCV-insulin-IRES-EGFP 质粒转染 BMSCs 组小鼠血糖水平明显下降 ($P < 0.05$),但仍高于正常对照组 ($P < 0.05$,表 2)。健康对照组小鼠体质量稳定上升;空质粒转染移植组则持续降低;而 pMSCV-insulin-IRES-EGFP 质粒转染 BMSCs 组在移植 1 周内下降,1 周后开始逐步上升,35 d 时超过了空质粒转染 BMSCs 移植组,但仍低于对照组 ($P < 0.05$,表 2)。

表 2 移植前后各组血糖、体质量的变化

Tab 2 Changes of blood glucose level and body weight before and after transplantation in each group

Group	Time after transfection t/d					
	0	7	14	21	28	35
Blood glucose $c_B / (\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$						
Vacuuous pMSCV	21.83 ± 2.36	21.46 ± 2.77	21.51 ± 3.02	21.26 ± 1.99	21.48 ± 2.84	21.84 ± 3.11
Recombinant plasmid	$21.52 \pm 2.65^\Delta$	$18.38 \pm 2.21^\Delta$	$18.07 \pm 2.58^\Delta$	$15.83 \pm 2.04^* \Delta$	$15.52 \pm 3.03^* \Delta$	$14.57 \pm 2.49^* \Delta$
Normal control	$5.32 \pm 1.76^*$	$5.38 \pm 1.43^*$	$5.5 \pm 1.66^*$	$5.43 \pm 1.27^*$	$5.35 \pm 1.58^*$	$5.42 \pm 1.71^*$
Body weight m_B / g						
Vacuuous pMSCV	21.54 ± 1.54	19.33 ± 2.14	18.23 ± 3.01	17.45 ± 2.44	16.83 ± 1.87	16.1 ± 1.25
Recombinant plasmid	21.12 ± 1.95	$18.79 \pm 2.31^\Delta$	$19.65 \pm 1.99^\Delta$	$20.23 \pm 1.88^\Delta$	$20.42 \pm 3.05^\Delta$	$20.72 \pm 2.24^* \Delta$
Normal control	23.23 ± 1.76	$23.47 \pm 2.58^*$	$24.15 \pm 1.47^*$	$24.93 \pm 3.22^*$	$25.63 \pm 2.04^*$	$26.43 \pm 1.65^*$

* $P < 0.05$ vs Vacuuous pMSCV group; $^\Delta P < 0.05$ vs Normal control group

3 讨论

重叠延伸 PCR 技术由于使用了具有互补末端的引物,使 PCR 产物形成了重叠链,从而在随后的扩增反应中通过重叠链的延伸,将不同来源的扩增片段重叠拼接起来,简单迅速地将多个 DNA 片段连在一起,用于嵌合基因的构建^[6]。SOE-PCR 的关

键主要在于引物的设计^[7],通过设计特定的搭桥引物,将两个目的序列融合在一起,避免了不必要的酶切和连接。更重要的是,重叠延伸对融合位点及其附近序列没有特殊要求,融合部位可以是任意位点,只要根据相应原理设计好搭桥引物就可以按照常规 PCR 轻松操作^[8]。因此,此技术在越来越多的实验室得到广泛的应用。

IRES 是广泛存在于一些真核细胞的 mRNA 或病毒基因组上的一类保守的顺式作用元件, 主要作用是通过与核糖体小亚基结合从而启动 5' 帽非依赖方式的翻译模式^[9]。国外研究^[10-11]提示内含子对基因表达调控的机制可能是某些内含子序列含有增强子或其他顺式作用元件; 内含子的剪接增加了 mRNA 在核内的稳定性; 内含子包含有一些能开放染色体的功能域序列, 可能通过影响核质成分、位置等来提高外源基因在转基因动物中的表达。

荧光蛋白标记技术是近年来迅速发展的一种新型细胞示踪技术, 具有易于检测、特异性强、可以实现活细胞观察等优势^[2]。逆转录病毒可以将 GFP 基因整合到被标记细胞的染色体中而获得稳定表达^[12], 使子代细胞获得与母代细胞一样的标记效果, 实现细胞的长时效标记, 这些标记细胞可以通过荧光显微镜直接观察, 而不需要反应底物, 更不需要通过复杂的免疫组织化学分析观察, 且被标记的细胞仍具有多向分化潜能, 明显优于其他的标记检测^[13]。

将胰岛素基因转入自体干细胞内, 让它们增殖分化成胰岛素分泌细胞, 再回植入糖尿病患者体内以治疗糖尿病, 具有广阔的临床应用前景。Moriscot 等^[14]用人的骨髓提取间充质干细胞, 以腺病毒作为载体, 进行基因转染, 该细胞几乎可以表达所有的胰岛 B 细胞相关基因。Lu 等^[15]将人的胰岛素基因转入人骨髓间充质细胞, 转染后细胞可以稳定分泌胰岛素。

本研究通过融合基因质粒转染技术, 构建质粒转染 BMSCs 后能够同时稳定表达 EGFP 和 insulin 两种外源性基因, 且互不影响, 在基因治疗糖尿病的同时利用 EGFP 基因的示踪可以充分了解融合基因的特征、理化特性及其功能机制以及移植细胞在体内的功能和分布, 为进一步研究基因转染技术治疗糖尿病提供了一个良好的思路。本研究通过基因转染干细胞技术成功获得了胰岛素分泌细胞, 并在糖尿病小鼠模型中取得了显著的治疗效果, 证实基因转染干细胞技术治疗糖尿病是一可行方法。基因转染干细胞技术治疗糖尿病目前虽然不是很成熟, 尚待解决免疫排斥、体内微环境调节等问题, 但是随着对干细胞研究的不断深入, 糖尿病的干细胞治疗方法一定会趋于成熟, 为彻底治愈糖尿病带来希望。

(志谢 本研究得到南通大学神经生物研究所丁斐教授及南通大学附属医院临床医学研究中心姚登福教授的大力支持和帮助, 在此一并表示感谢!)

[参 考 文 献]

- [1] 裴学涛. 骨髓间充质干细胞[M]//裴学涛. 干细胞生物学. 北京: 科学出版社, 2003: 452-456.
- [2] Shimomura O. The discovery of aequorin and green fluorescent protein[J]. J Microsc, 2005, 217(Pt 1): 1-15.
- [3] Lee R H, Seo M J, Reger R L, Spees J L, Pulin A A, Olson S D, et al. Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103: 17438-17443.
- [4] Ezquer F E, Ezquer M E, Parrau D B, Carpio D, Yañez A J, Conget P A. Systemic administration of multipotent mesenchymal stromal cells reverts hyperglycemia and prevents nephropathy in type 1 diabetic mice[J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2008, 14: 631-640.
- [5] Zhao M, Amiel S A, Ajami S, Jiang J, Rela M, Heaton N, et al. Amelioration of streptozotocin-induced diabetes in mice with cells derived from human marrow stromal cells[J]. PLoS ONE, 2008, 3: e2666.
- [6] Jensen P H, Weilguny D. Combination primer polymerase chain reaction for multi-site mutagenesis of close proximity sites[J]. J Biomol Tech, 2005, 16: 336-340.
- [7] 徐 芳, 姚泉洪, 熊爱生, 彭日荷, 侯喜林, 曹 兵. 重叠延伸 PCR 技术及其在基因工程上的应用[J]. 分子植物育种, 2006, 4: 747-750.
- [8] Heckman K L, Pease L R. Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension[J]. Nat Protoc, 2007, 2: 924-932.
- [9] 严 飞, 赵新宇, 邓洪新, 魏于全. 一种新的二元表达质粒 Pcmv-Myc-IRES-EGFP 的构建及其表达[J]. 生物工程学报, 2007, 23: 423-428.
- [10] Bachl J, Olsson C, Chitkara N, Wabl M. The Ig mutator is dependent on the presence, position, and orientation of the large intron enhancer[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 2396-2399.
- [11] Nobuyoshi M, Lin X H, Takimoto Y, Deuel T F, Wang Z Y. Transcription regulation of the PDGF A-chain gene by first intron elements[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 230: 569-572.
- [12] BløM, Micklem D R, Lorens J B. Enhanced gene expression from retroviral vectors[J]. BMC Biotechnol, 2008, 8: 19.
- [13] Stuelten C H, Kamaraju A K, Wakefield L M, Roberts A B. Lentiviral reporter constructs for fluorescence tracking of the temporospatial pattern of Smad3 signaling[J]. Biotechniques, 2007, 43: 289-290, 292, 294.
- [14] Moriscot C, de Fraipont F, Richard M J, Marchand M, Savatier P, Bosco D, et al. Human bone marrow mesenchymal stem cells can express insulin and key transcription factors of the endocrine pancreas developmental pathway upon genetic and/or microenvironmental manipulation *in vitro* [J]. Stem Cells, 2005, 23: 594-603.
- [15] Lu Y, Wang Z, Zhu M. Human bone marrow mesenchymal stem cells transfected with human insulin genes can secrete insulin stably[J]. Ann Clin Lab Sci, 2006, 36: 127-136.

[本文编辑] 贾泽军