

人生长激素慢病毒载体的构建及其在鼠骨骼肌成肌细胞中的表达 Construction of Human Growth Hormone Lentiviral Vector and its Expression in Murine Skeletal Myoblasts

刘向阳^{1**}, 卢永昕^{1*}, 徐玉兰¹, 李小青², 刘 隽², 李爱华¹, 罗萍¹, 万建平¹

LIU Xiang-Yang^{1**}, LU Yong-Xin^{1*}, XU Yu-Lan¹, LI Xiao-Qing², LIU Juan², LI Ai-Hua¹, LUO Ping¹ and WAN Jian-Ping¹

1 华中科技大学同济医学院附属协和医院心血管内科, 武汉 430022

2 华中科技大学同济医学院附属协和医院湖北省干细胞应用与研究中心, 武汉 430022

1 Department of cardiology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China

2 HuBei Province Stem cell Research & Applying Center, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China

摘 要 构建能表达人生长激素(hGH)的 pLentivirus6/V5-hGH 载体,并实现 hGH 基因在骨骼肌成肌细胞中大量、长期和稳定的表达。体外培养 SD 鼠骨骼肌成肌细胞,并通过免疫组织化学方法鉴定所得细胞、用台盼兰染色确定培养细胞的活性并绘制生长曲线。将目的基因 hGH 亚克隆到真核细胞表达载体 pLenti6/V5-D-TOPO 载体上,构建重组质粒 pLentivirus6/V5-hGH。将 pLenti6/V5-hGH 及阳性对照质粒 pLenti6/V5-EGFP 分别用 Lipofectamin 2000 介导转染体外培养的 SD 乳鼠骨骼肌成肌细胞。在激光共聚焦扫描显微镜下计数,确定阳性对照质粒的转染数,从而估计该基因的转染效率。加入筛选试剂以获得稳定表达异源生长激素(hGH)的成肌细胞。收集转染及筛选后的细胞培养基,用放射免疫分析法(RIA)检测重组人生长激素(rhGH)的表达水平。聚合酶链式反应法(PCR)及 DNA 测序显示 hGH 基因成功地插入到 pLenti6/V5-D-TOPO 载体中;阳性对照质粒转染细胞 24 h 后,在激光共聚焦显微镜下观察,其转染效率达 40% 以上。检测收集的上清,与对照组相比,有极显著差异($P < 0.01$),观察至第 8 周, rhGH 仍持续稳定表达。通过检测培养的 chang-liver 肝细胞上清中胰岛素样生长因子-1(IGF-1)的水平,验证了 rhGH 的生物学活性。实验通过培养高纯度的成肌细胞,构建了能在真核细胞内表达 hGH 的重组质粒 pLenti6/V5-hGH,实现了 hGH 基因在骨骼肌成肌细胞中大量、长期和稳定的表达,并且获得的 rhGH 具有较强的促进肝细胞分泌 IGF-1 的能力。

关键词 生长激素,慢病毒载体,载体构建,成肌细胞,基因表达

中图分类号 Q575.11 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)02-0243-06

Abstract The aim of this study is to construct a lentiviral vector encoding human growth hormone, and to achieve the long, efficient and stable expression in murine skeletal myoblasts. Primary skeletal myoblasts were isolated from Sprague-Dawley rats and cultured by enzymatic digestion. We tested them by Desmin immunohistochemistry stains and found their viability was up to 94% by Trypan blue. Human growth hormone (hGH) cDNA was subcloned into expression vector pLenti6/V5-D-TOPO to construct recombinant pLenti6/V5-hGH. The pLenti6/V5-hGH and the constructed pLenti6/V5-EGFP were transfected into murine skeletal myoblasts by the Lipofectamin 2000. Through counting by the Confocal Laser Scanning Microscope, we identified the transfection efficiency. We added the blasticidin to the 6-well plate with lids and obtained stable myoblasts expressing hGH. The

Received: November 11, 2005; Accepted: December 7, 2005.

This work was supported by Grants from Chinese National Programs for High Technology Research and Development(No: 2002AA745070).

* Corresponding author. Tel: 86-27-87543537; E-mail: yongxin-lu6@yahoo.com.cn; ** longliu0714@163.com

国家高技术研究发展计划(863 计划)资助项目(No: 2002AA745070). © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

concentration of human growth hormone (hGH) in cell culture medium was detected by Radioimmunoassay (RIA). Polymerase Chain Reaction (PCR) and DNA sequence showed hGH cDNA had been correctly inserted into pLenti6/V5-D-TOPO vector. Bright green fluorescence of the transfected cells could be observed under the Confocal Laser Scanning Microscope after 24 h transfection with pLenti6/V5-EGFP plasmids, and the transfection rate reached 40%. The difference was distinct ($P < 0.01$) between the pLenti6/V5-hGH groups and control groups in the secretive level of human growth hormone. After 8 weeks, the expression of human growth hormone was still stable. Then, we validated the biological characterization of the rhGH by the enzyme-link immunosorbent assay (ELISA) of the Insulin-like growth factor I (IGF-1). These results demonstrate we have successfully constructed the recombinant pLenti6/V5-hGH plasmids and accomplished rhGH long, efficient and stable expression ectopic in skeletal muscle myoblasts.

Key words human growth hormone, lentiviral vector, vector construction, myoblast, gene expression

hGH 是由垂体前叶嗜酸性粒细胞分泌的含 191 个氨基酸的疏水性球蛋白,它的主要生理作用是促进生长、蛋白质合成和影响脂肪、糖及能量代谢。随着对 hGH 的基础和临床研究的深入,人们认识到它能作用于 T 淋巴细胞^[1],从而调节炎症反应^[2],并能用于多种心血管疾病的预防^[3]和治疗^[4],因而 hGH 在心血管疾病中的应用已成为大家关注的热点。目前,临床使用的重组人生长激素 (rhGH),主要采用注射方法。此法受治疗的依从性、剂型和使用方法的影响;其半衰期短,无法保持足够有效的血药浓度。为了更好地促进 hGH 在临床疾病中的有效应用,本实验拟将 hGH 基因通过慢病毒载体的介导,实现其在鼠骨骼肌成肌细胞中长期表达并稳定分泌。

1 材料与方法

1.1 材料

pZ12-l-hGH-1 质粒由美国 Ariad 公司惠赠, pLenti6/V5-D-TOPO 载体、pLenti6/V5-EGFP 质粒由武汉协和医院湖北省干细胞应用与研究中心提供, Lipofectamine 2000 为 Invitrogen 公司产品, chang-liver 肝细胞由广州中山大学许志威博士惠赠, SD 乳鼠购自华中科技大学同济医学院实验动物中心,新生牛血清、DMEM、RPMI-1640 和胰蛋白酶为 GIBCO 公司产品,结蛋白 (Desmin) 抗体为 Lab Vision 公司产品,引物由上海生物工程技术有限公司合成, PCR 产物回收纯化试剂盒为 Zymor 公司产品,质粒提取试剂盒购自中鼎生物技术有限公司, IGF-1 ELISA 检测试剂盒为德国 DRG 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 引物的设计与合成:选取 hGH 基因编码区两侧的碱基序列,合成相应的引物;另根据 pLenti6/V5-D-TOPO 载体引物设计的要求,在 hGH 基因起始

密码子 ATG 前加上 4 个碱基 CACC,引物序列见表 1。

表 1 PCR 扩增所用的引物及其序列

Table 1 Primer sequences used for the PCR amplification

Construct	Primer sequence
hGH	5'- CACCATG GCT ACA GGC TCC CGG ACG -3'
	5'- TTA TT CCA GGG CCA GGA GAG GCA CTG -3'

1.2.2 重组质粒 pLenti6/V5-hGH 的构建:如图 1,以 pZ12-l-hGH-1 质粒为模板,加入 hGH 基因的上、下游引物,在 Deep VentR 高保真聚合酶的作用下,先 94℃ 预变性 10min,再 94℃ 变性 30s、63℃ 退火 30s、72℃ 延伸 45s,共 25 个循环,合成 hGH 基因(全长 715bp),PCR 产物回收试剂盒回收 PCR 产物,即得到纯化的目的基因片段。将目的基因片段和 pLenti6/V5-D-TOPO 载体按照 pLenti6/V5-D-TOPO 载体试剂盒的说明书,取 1μL PCR 产物,1μL 载体(尽量保证 PCR 产物与载体的摩尔比为 0.5:1~2:1),1μL 盐水,3μL 无菌水,共计 6μL;室温温育 5~10min,使 PCR 产物和载体连接,然后转化至 Stbl3 感受态大肠杆菌中,将转化菌在含氨苄青霉素(ampicillin)和稻瘟菌素(blasticidin)的 LA 平皿中克隆后,挑单克隆菌落行 PCR 鉴定,选取正确的转化子进行大量扩增,提取质粒。

1.2.3 鼠骨骼肌成肌细胞的分离、培养与鉴定:取 3~5 d 的 SD 乳鼠,去头处死,仔细分离后肢肌肉,尽量去除皮肤、筋膜、肌腱及血管组织。无菌 PBS 浸洗 3~5 遍以去除血细胞,加 0.2% 胰酶 37℃ 水浴锅中震荡消化 10~15min,取上部悬液转入离心管,重复 3~4 次至肌组织完全消化,加入含 20% 新生牛血清的 DMEM 培养基于离心管中终止消化,离心、弃上清,将细胞转入培养瓶,加入适量含 20% 新生牛血清的 DMEM 培养基,差速贴壁 1h 以获得纯化的成肌细胞。隔天换液,并于第 4 d 将细胞用

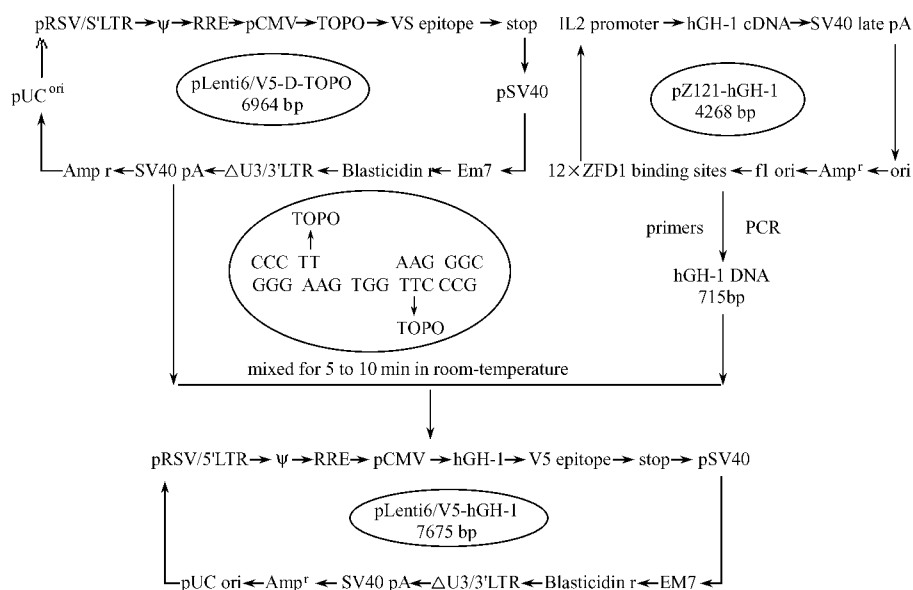


图1 pLentivirus6/V5-hGH 重组载体的构建

Fig. 1 Construction of recombinant lentiviral vector pLentivirus6/V5-hGH

0.2% 胰酶消化转至 6 孔培养板(细胞数为 10^5 /孔)以用于成肌细胞生长曲线的绘制和质粒的转染。同时取成肌细胞以 10^9 /L 接种于生长载玻片, 37°C 、5% CO_2 孵箱孵育 24 h 经 4°C D-Hanks 液洗涤 2 次,冷丙酮固定 15min。按常规 SP 染色方法进行 Desmin 鉴定。

1.2.4 成肌细胞存活率的检查和细胞生长曲线的绘制:取第 4 d 胰酶消化的细胞悬液,吹打均匀后吸取 $100\mu\text{L}$ 于一塑料离心管内,另加入 $100\mu\text{L}$ 4g/L 的台盼蓝,充分混匀;吸取 1 滴于血细胞计数板上,倒置显微镜下观察,凡着色者为不正常或已死亡细胞。同时上述用于绘制成肌细胞生长曲线的细胞连续培养 8 d,以了解细胞的生长情况。

1.2.5 成肌细胞的转染和筛选:待 6 孔板中的细胞长满到约 80% 时开始细胞转染。细胞分组:实验组(转染质粒为 pLenti6/V5-hGH),阳性对照组(转染质粒为 pLenti6/V5-EGFP),筛选对照组(没有加质粒,只加筛选试剂以确定没有转染抗性基因质粒的细胞被杀死的时间),阴性对照组(没有加质粒和筛选试剂)。转染步骤参照 Lipofectamine 2000 的说明书。转染 24 h 后换液,加入稻瘟菌素(blasticidin) $4\mu\text{g}/\text{mL}$ 进行筛选,每 3~4 d 换液,共 14 d。

1.2.6 转染效率的检测:转染约 24 h 后随机选择 3~5 个视野/孔,在激光共聚焦显微镜的激光(488nm)激发下观察计数,以发绿色荧光细胞的平均数与总细胞平均数的比值来估计质粒的转染效率。

1.2.7 鼠骨骼肌成肌细胞分泌 rhGH 的检测:在预期时间里收集上清, $4000\text{r}/\text{min} \times 10\text{min}$ 离心,取上清 $200\mu\text{L}$, -20°C 保存。用放射免疫法检测细胞培养上清中的 rhGH 的含量(由武汉协和医院核医学科完成)。

1.2.8 rhGH 生物学活性的检测:取对数生长期 chang-liver 肝细胞,接种到 24 孔培养板的 12 孔中,每孔细胞约 2×10^4 。其中 4 孔(A 组)加 10% 新生牛血清的 RPMI-1640 培养基 1mL , 4 孔(B 组)加 12.5% 新生牛血清的 RPMI-1640 培养基 $800\mu\text{L}$ 及阳性对照组的的上清液 $200\mu\text{L}$, 剩余 4 孔(C 组)加 12.5% 新生牛血清的 RPMI-1640 培养基 $800\mu\text{L}$ 和已经测定了浓度的实验组上清液 $200\mu\text{L}$ (浓度约为 $60\text{ng}/\text{mL}$)。置于 37°C 、5% CO_2 孵育箱 24 h、48 h、72 h 后,用 IGF-1 ELISA 试剂盒检测培养上清液中 IGF-1 的浓度,操作步骤严格按照试剂盒的说明书。

1.2.9 数据的统计与分析:数据均以 $\bar{x} \pm S$ 表示,统计方法为 t 检验。

2 结果

2.1 pLenti6/V5-hGH 的鉴定

挑单克隆菌落,用载体上的引物(见表 2),及目的基因的引物(见表 1)做 PCR,产物在 0.8% 凝胶里电泳 15min,结果如图 2;质粒测序由大连宝生物完成,测序引物为载体上的 CMV 上游引物(CMV Forward)和 V5 下游引物(V5 Reverse)。测序结果显示插入序列与 GenBank 中(NM_000515 // gi:20809248)

的编码区序列完全一致。

表 2 载体测序所用的引物及其序列

Table 2 Primer sequences used for the hGH sequence

Sequence	Primer sequence
CMV Forward	5'- CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG -3'
V5 (C-term) Reverse	5'- ACCGAGGAGAGGGTTAGGGAT -3'

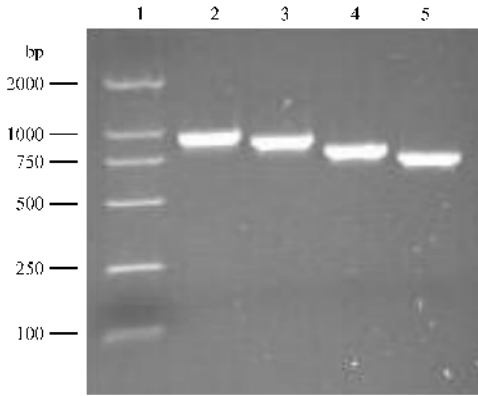


图 2 以 pLenti6/V5-hGH 为模板,用不同的引物做 PCR 鉴定质粒的琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis pattern of the PCR products of recombinant pLenti6/V5-hGH plasmid with different primers

1 : marker : DL2000 ; 2 : CMV F/V5 R (940 bp) ; 3 : CMV F/hGH R (877 bp) ; 4 : hGH F/V5 R (778 bp) ; 5 : hGH F/hGH R (715 bp) (bp : base pair ; F : forward ; R : Reverse).

2.2 Desmin 免疫细胞化学染色

将分裂增殖 4 d、0.2% 胰酶消化的成肌细胞在生长载玻片上孵育 24 h 后用 desmin 抗体进行常规 SP 染色,结果如图 3 示:94% 的成肌细胞 Desmin 胞浆呈阳性反应,细胞核外周及胞浆呈棕色或棕黄色,表明培养的细胞为成肌细胞。

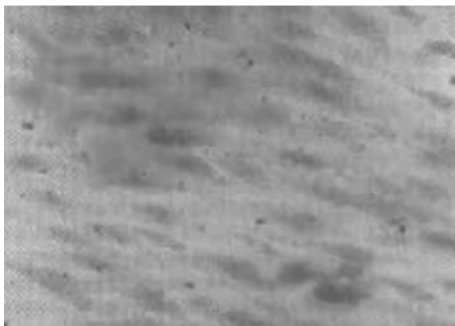


图 3 成肌细胞 desmin 染色阳性(倒置显微镜 $\times 200$)

Fig. 3 Myoblast immunocytochemistry stained by Desmin antibody (inverted microscope $\times 200$): cell nucleus and cytoplasm were showed positive stain

2.3 成肌细胞生长活性检测和生长曲线的绘制

台酚蓝染色后 94% 的细胞不着色,说明本实验

方法培养的细胞存活率高。细胞连续计数所绘制的成肌细胞生长曲线显示:细胞在培养的第 3~5 天增殖达高峰,5 d 后基本达生长平台期(图 4)。

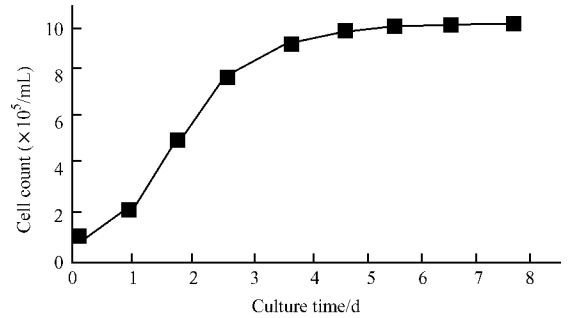


图 4 成肌细胞生长曲线图

Fig. 4 The growth curve of myoblast

2.4 转染效率的检测

以质粒 pLenti6/V5-EGFP 为对照质粒,用 Lipofectamine 2000 转染成肌细胞,其瞬时转染效率达 40% 以上。图 5 中,绿色荧光的细胞为已经成功导入重组质粒并表达的细胞。

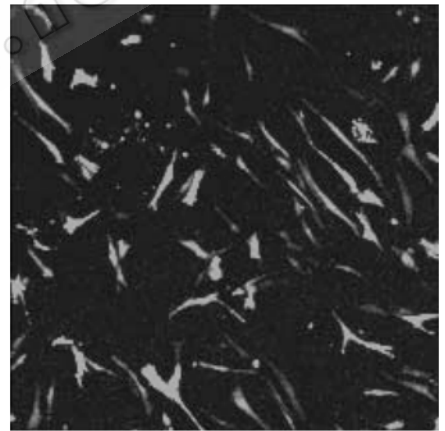


图 5 激光共聚焦扫描显微镜下 ($\times 20$) pLenti6/V5-EGFP 转染效率图

Fig. 5 The transfection efficiency of recombinant pLenti6/V5-EGFP under the Confocal Laser Scanning Microscope ($\times 20$)

2.5 细胞筛选结果及重组人生长激素(rhGH)检测

在加入 blasticidin 后第 14 d,筛选对照组和阴性对照组细胞全部死亡。RIA 检测结果示:实验组细胞在转染 24 h 后(还没加入筛选试剂),rhGH 的分泌量为(35.9 \pm 4.2) ng/mL,筛选 2 周后为(107.2 \pm 3.7) ng/mL。表 3 显示的是观察的 8 周中各个时间点 rhGH 的分泌量。对照组没有检测到 rhGH,与实验组结果相比,有极显著差异($P < 0.01$)。

2.6 rhGH 生物学活性的检测结果

分别在 24 h、48 h、72 h 取 100 μ L 上清,ELISA 检

表 3 不同时间点 rhGH 的分泌浓度
Table 3 The secreted concentration of the rhGH in different time

Concentration of the rhGH (ng/mL)	The								
	1 st day	1 st week	2 nd week	3 rd week	4 th week	5 th week	6 th week	7 th week	8 th week
	35.9 ± 4.2	58.9 ± 3.3	107.2 ± 3.7	157.4 ± 6.7	145.9 ± 3.6	127.8 ± 7.0	130.7 ± 9.3	119.4 ± 2.4	118.4 ± 5.4

测结果如图 6。可见,在加入 rhGH 后,chang-liver 肝细胞分泌 IGF-1 的能力大大增强 ($P < 0.01$)。因此,通过本方法获得的 rhGH 具有较强的生物学活性。

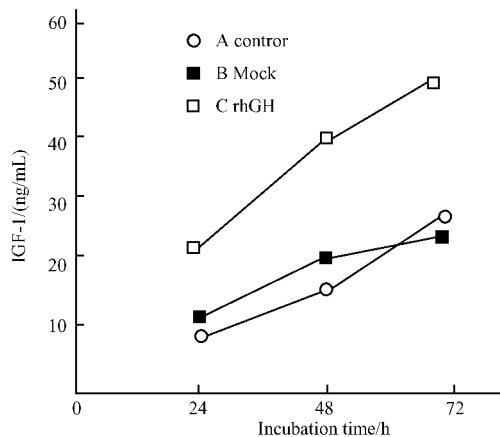


图 6 不同时间点 chang-liver 肝细胞 IGF-1 的分泌水平
(A 加 10% 的新生牛血清的 PRMI-1640 培养基 1mL, B 加 800 μ L 10% PRMI-1640 和 200 μ L 阳性对照液)
Fig. 6 Time-course effect of 10% condition medium on secretion of IGF-1 (A: 1mL 10% PRMI-1640; B: 800 μ L 12.5% PRMI-1640 + 200 μ L supernatant of positive control).

3 讨论

近年来,易于从肌肉组织中分离、培养、鉴定^[5]及外源转染^[6]的骨骼肌成肌细胞已经成为外源重组蛋白质的表达和释放系统。它能够不断地增殖,并使外源基因在其中长期、稳定地表达。Vanderburgh HH^[7]等成功运用骨骼肌成肌细胞构建了能长期存活并可被移植的生物人工肌肉;Lu YX^[8]等对 VEGF 基因修饰的生物人工肌肉在动物体内的实验已获成功。目前,研究疾病基因治疗的外源基因的导入方法主要有磷酸钙共沉淀法、电穿孔法、裸质粒直接注射和载体介导等,但研究最多的还是病毒载体介导。病毒载体包括腺病毒载体、腺相关病毒载体、鼠白血病逆转录病毒载体及慢病毒载体等。腺病毒载体经包装后能产生高滴度的病毒颗粒,能感染分裂和非分裂细胞,却不能将外源基因整合到染色体上,且能引起较严重的免疫反应;腺相关病毒载体能将外源基因导入细胞,并且很少产生免疫反应^[9],然而,其

插入片段 < 4.5 kb 转染效率较低。鼠白血病逆转录病毒载体则只能转染增殖期细胞^[10]。本实验所用的慢病毒载体(pLenti6/V5-D-TOPO)是由 AIDS 病原体改建而来,属逆转录病毒亚属,但它的宿主范围比传统的逆转录病毒载体更为广泛,甚至能够转染并将目的基因整合到中枢神经系统的细胞^[11]。另外,它还具有免疫反应小、生物安全性高的特点。然而,慢病毒载体携带基因较小(< 10 kb)是其使用的限制因素之一。并且,目前人们对慢病毒载体应用于临床的安全性还存在诸多顾虑,故尚需进一步通过各种实验做出充分评估,但其能够瞬间或长期转染多种细胞的特点势将使其成为一类很有前途的基因转移载体。

本实验采用 pLenti6/V5-D-TOPO 载体,插入 hGH 基因,从而构建了 pLentivirus6/V5-hGH 重组质粒。根据载体的特性,我们设计了特异性的引物,在 Deep VentR 高保真聚合酶下,很方便的通过 PCR 法获得带钝末端的 hGH 片段。获得的片段在室温下简单的与载体孵育 5 ~ 10min,即可使两者相连,省却了繁琐而漫长的酶切、连接等过程。在质粒的鉴别上,依靠载体自带的引物,一方面通过 PCR 就可鉴别目的基因插入的方向正确与否,另一方面,利用双向测序法,可知插入片段的序列与 GenBank 中的 hGH-1 编码区完全一致。此类载体对肌细胞的转染率非常高。Cudre-Mauroux C 等^[12]用经 293FT 细胞包装获得的 lentiviral-EGFP 病毒颗粒感染肌卫星细胞,其效率达 80%,Bachrach E 等^[13]用此型载体对肌前体细胞的感染率几乎达 100%。本实验所取得的瞬时转染效率虽然只达 40%,但这是在未经三质粒共转染 293FT 细胞包装成病毒颗粒的情况下所取得的。这样,我们不仅简化了实验步骤,也大大节约了实验成本。质粒转染细胞后,24 h 蛋白质的分泌量为(35.9 ± 4.2) ng/mL,第 3 周达高峰,为(157.4 ± 6.7) ng/mL;观察至第 8 周,其分泌量仍稳定在(118.4 ± 5.4) ng/mL。与耿朝晖等用的 rAcV-Bac- Δ 1hGH^[14]和李锋等用的 pcDNA-hGH^[15]相比,本实验所构建载体对细胞的转染,无论是蛋白质表达的观察时间,还是蛋白质分泌的水平,都明显高于前两者

($P < 0.01$) 并且初步实现了 hGH 在能够组织工程为生物人工肌肉的骨骼肌成肌细胞中长时间的表达。当我们把分泌的 rhGH 加到培养 chang-liver 肝细胞的培养基中时,发现肝细胞分泌 IGF-1 能力有很大提高,从而验证了本实验获得的 rhGH 的生物学活性。此外,本实验所用的阳性对照质粒 pLenti6/V5-EGFP,因转染后表达的荧光均匀地分布于细胞核和细胞浆^[16],所以我们在观察估计转染效率的时候,可以明确地看到成肌细胞的形态。

总之,本实验成功构建了 pLentivirus6/V5-hGH,实现了其在鼠骨骼肌成肌细胞中的长期、大量、稳定的表达,并证明了 rhGH 具有促进肝细胞分泌 IGF-1 的能力,为进一步研究 hGH 的基因治疗在心血管疾病中的应用提供了一种好的选择,同时也为下一步的含 hGH 的组织工程生物人工肌肉的构建提供了良好的载体。

致谢 湖北省干细胞应用与研究中心的张佳华工程师为本文提供了帮助,特此致谢。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Yamashita N, Hashimoto Y, Honjo M *et al.* The effect of growth hormone on the proliferation of human Th cell clones. *Life Sci*, 2000, **66**(20):1929 - 1935
- [2] Garcia-Esteso F, Pascual G, Garcia-Hondurilla N *et al.* Histological evaluation of scar tissue inflammatory response: the role of hGH in diabetic rats. *Histol Histopathol*. 2005, **20**(1):53 - 57
- [3] Laron Z, Wang XL, Klinger B *et al.* Growth hormone increases and insulin-like growth factor-I decreases circulating lipoprotein(a). *Eur J Endocrinol*. 1998, **138**(2):189 - 190
- [4] Tsai TP, Yu JM, Wu YL *et al.* Change of serum growth factors in infants with isolated ventricular defect undergoing surgical repair. *Ann Thorac Surg*. 2002, **73**(6):1765 - 1768
- [5] Fishchman D A. Monoclonal antibodies to desmin: evidence for stage dependent intermediate filament immunoreactivity during cardiac and skeletal muscle development. *Ann NY Acad Sci*, 1985, **455**(2):167 - 184
- [6] Jonghoe B, Kim SH, Kim SZ, Heard JM, Huh JE *et al.* Ectopic expression of active processed form of atrial natriuretic peptide in skeletal myoblast. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, **270**(2):637 - 642
- [7] Vanderburgh HH, Del Tatto M, Shansky J *et al.* Tissue engineered skeletal muscle organoids for reversible gene therapy. *Hum Gene Ther*, 1996, **7**:2195 - 2200
- [8] Lu YX, Shansky J, Del Tatto M *et al.* Recombinant vascular endothelial growth factor secreted from tissue engineered bioartificial muscle promotes localized angiogenesis. *Circulation*, 2001, **104**:594 - 599
- [9] Tenenbaum L, Lehtonen E, Monahan PE. Evaluation of risks related to the use of adeno-associated virus-based vectors. *Curr Gene Ther*, 2003, **3**(6):545 - 565
- [10] Zhu NL, Wu L, Liu PX *et al.* Downregulation of cyclin G1 expression by retrovirus-mediated antisense gene transfer inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation. *Circulation*, 1997, **96**:628 - 635
- [11] Englund U, Ericson C, Rosenblad C *et al.* The use of a recombinant lentiviral vector for ex vivo gene transfer into the rat CNS. *Neuroreport*, 2000, **11**(18):3973 - 3977
- [12] Cudre-Mauroux C, Occhiodoro T, Konig S *et al.* Lentivector-Mediated Transfer of Bmi-1 and Telomerase in Muscle Satellite Cells Yields a Duchenne Myoblast Cell Line with Long-Term Genotypic and Phenotypic Stability. *Hum Gene Ther*, 2003, **14**(16):1525 - 1533
- [13] Bachrach E, Li S, Perez AL *et al.* Systemic delivery of human microdystrophin to regenerating mouse dystrophic muscle by muscle progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, **101**(10):3581 - 3586
- [14] Geng ZH(耿朝晖), Liu Y(刘莹), Gao P(郜鹏) *et al.* Enhancing hGH Expression Level in Insect Cells by Shortening the 5'-UTR of hGH cDNA. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报) 2002, **18**(4):505 - 508
- [15] Li F(李锋), Lu YX(卢永昕), Zhu JF(朱记法) *et al.* Construction of vector encoding human growth hormone and expression in murine primary myoblasts. *J Clin Cardiol (China)* (临床心血管病杂志) 2004, **20**(8):479 - 481
- [16] Rubart M, Soonpaa MH, Nakajima H *et al.* Spontaneous and evoked intracellular calcium transients in donor-derived myocytes following intracardiac myoblast transplantation. *J Clin Invest*, 2004, **114**(6):775 - 783