

携带人二氢叶酸还原酶基因慢病毒表达载体构建及鉴定*

李 状 王 琪 张 玮 阳志军 黄明钜 李 力[△]

(广西医科大学肿瘤医院妇科 广西 南宁 530021)

摘要 目的:构建携带人二氢叶酸还原酶(DHFR)基因的慢病毒表达载体 pWPI。方法:采用 PCR 方法扩增二氢叶酸还原酶 cDNA 全长,与 EZ-T 克隆载体连接, HindIII 及 BamHI-HF 限制性内切酶双酶切回收的 PCR 片段并补平其缺口。慢病毒系统载体使用 pWPI 系统,采用 PmeI 酶切载体后回收片段,将其磷酸化, T4 酶连接载体与目的基因。表达载体鉴定均采用核苷酸序列测定,重组质粒采用脂质体转染 293T 包装细胞后获得包装的病毒颗粒。结果:成功扩增二氢叶酸还原酶全长并连接入 pWPI 载体构建重组表达载体 DHFR-pWPI,重组质粒测序结果与 DHFR 基因的同源性达 100%,按标准生产程序转染 293T 后有 DHFR 基因的表达。结论:成功采用慢病毒载体系统构建了二氢叶酸还原酶重组慢病毒转基因,为探讨 DHFR 在肿瘤多药耐药过程中的分子机理奠定基础。

关键词: DHFR, 慢病毒载体 Pwpi, 293T 细胞

中图分类号: R75, R78 **文献标识码**: A **文章编号**: 1673-6273(2012)10-1831-06

Construction of a Lentiviral Expression Vector Harboring Human Dihydrofolate Reductase Gene*

LI Zhuang, WANG Qi, ZHANG Wei, YANG Zhi-jun, HUANG Ming-ju, LI Li[△]

(Department of Gynecology Oncology, Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021 China)

ABSTRACT Objective: To construct a lentiviral expressing vector harboring human Dihydrofolate reductase (DHFR) gene.

Methods: The cDNA length of DHFR gene was amplified by PCR and was connected to cloned vector EZ-T, then the recovered PCR fragment was obtained by digesting with restriction enzymes named HindIII and BamHI-HF, and then blunted at the gap. Lentiviral vector system adopted pWPI system. The vector pWPI was digested with PmeI enzyme, and then it was recovered fragment and phosphorylated. The phosphorylated vector was connected with DHFR gene by T4 enzyme. Recombinant plasmid was confirmed by PCR and sequencing nucleotide. The recombinant retroviral vector pWPI was selected to transfect packaging cell 293T to gain virus particles with infection ability. **Results**: The recombinant plasmid, named DHFR-pWPI, which was constructed and identified. Packaged by packaging cell 293T. The homology between sequencing results and DHFR gene sequence was up to 100%, and the expression of DHFR in 293T cells was determined by RT-PCR. **Conclusion**: The lentiviral expressing vector harboring human DHFR has been constructed successfully, which made the foundation to explore the molecular mechanism of multidrug-resistance in tumor.

Key words: DHFR; Lentiviral expression vector; 293T cell lines

Chinese Library Classification(CLC): R75, R78 **Document code**: A

Article ID: 1673-6273(2012)10-1831-06

前言

二氢叶酸还原酶(DHFR)是一种利用 NADPH 还原二氢叶酸产生四氢叶酸的氧化还原酶。其分子量约为 2 万,是催化叶酸还原成四氢叶酸(H4FA)的酶。H4FA 形成过程分两步进行,由同一个酶催化, H4FA 作为一碳单位载体,为嘌呤核苷酸从头合成和胸嘧啶核苷酸合成等提供一碳单位。叶酸缺乏可能导致 DNA 损伤、不稳定和 DNA 甲基化畸形状,这在肿瘤发生过程中起重要作用。叶酸的障碍也可能与卵巢癌的发生有关^[1]。叶酸主要包括叶酸受体、二氢叶酸还原酶、四氢叶酸还原酶。叶酸受体是一种糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚定膜蛋白,可介导细胞

外叶酸进入细胞内^[2],是目前抗肿瘤治疗研究的重要靶点^[3],而二氢叶酸还原酶是叶酸受体的下游。高海德等^[4]观察到双突变 DHFR 基因(酶活性增高)对大剂量氮甲喋呤(methotrexate MTX)化疗小鼠骨髓细胞具有保护作用。此外,有文献报道^[5,6,7] DHFR 在白血病耐药细胞株、人骨肉瘤耐药细胞株及耐药乳腺癌细胞株等肿瘤耐药细胞株中高表达,并且在肿瘤多药耐药中发挥着一定的作用。目前还没有文献报道 DHFR 与卵巢癌多药耐药的关系,为进一步探讨这两者之间的关系,我们构建了高拷贝 DHFR-pWPI 重组慢病毒表达载体,同时也为后续研究卵巢癌细胞的多药耐药机制实验做了良好的铺垫。

1 材料与方法

* 基金项目:国家自然科学基金资助(30960404),研究生科研创新项目及改革和发展项目(309356)

作者简介:李状(1986-),女,硕士生,主要研究方向:叶酸代谢酶与卵巢癌多药耐药关系,

Tel: 13877105460, E-mail: 196071813@qq.com

△通讯作者:李力, Tel: 0771-5310430, E-mail: lili@gxmu.edu.cn

(收稿日期: 2011-10-12 接受日期: 2011-11-10)

1.1 材料

1.1.1 质粒、细胞及菌株 慢病毒系统表达质粒 pWPI、结构质粒 pCMV-dR 8.74 和封套质粒 pMD2.G 由加拿大渥太华大学临床肿瘤中心实验室惠赠。DHFR-EZ-T 质粒由本人构建。大肠杆菌 DH-5a、人肾上皮细胞 293T 细胞、人卵巢上皮癌细胞系 SKOV3 由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂 限制性内切酶 PmeI 和快速连接试剂盒购自纽英伦生物技术公司生产, QIAquick Gel Extraction Kit 购自 Qia-gen 产品, 碱性磷酸酶(SAP)购自 TATAKA 公司, T4 DNA Polymerase 和 First Strand cDNA Synthesis Kit 逆转录试剂盒购自 MBI Fermentas, RT 逆转录试剂盒由 TOYOBO 公司提供, M-MLV 逆转录酶由 Promega 公司提供。TIANGEN 质粒小提试剂盒购自北京 TIANGEN 有限公司, LipofectamineTM2000、Trizol Reagent 购自美国 Invitrogen 公司。补平试剂盒购自 Genestar 公司。

1.1.3 引物的设计与合成 人 DHFR cDNA 全长根据 Genbank 人 DHFR mRNA (NM_000791) 序列用 primer5.0 软件设计引物。DHFR 基因上游引物 5' GTCATGGTTGGTTCGCTAAACTGCA 3' 下游引物 5' TAGAGACAAGAGTAGTGGGGAATAA 3' 引物由上海生物工程公司合成。

1.2 方法

1.2.1 EZ-T-DHFR 质粒构建

1.2.1.1 组织 RNA 提取与 cDNA 合成 组织 RNA 提取采用 Trizol 一步法提取卵巢组织 RNA, cDNA 的合成采用 RT 逆转录试剂盒 (TOYOBO 公司提供, M-MLV 逆转录酶 Promega 公司提供) 操作按说明书。

1.2.1.2 DHFR 基因全长的扩增及连接 以合成的 cDNA 为模板, 在 94 °C 预变性 5 min (94 °C 30 sec, 67 °C 30 sec, 72 °C 30 sec) 30 cycles 72 °C 10 min 的 PCR 反应条件下扩增, 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后切胶回收目的片段, EZ-T cloning vector 1 μl, Purified PCR Product 4 μl, EZ-T DNA Ligase 1 μl, 10* Ligation Buffer 1 μl, ddH₂O up to 10 μl。16 °C 反应过夜后将连接产物转化至大肠杆菌 DH-5a 制备的感受态, 从 37 °C 培养 16-20 小时的 DH-5a 平皿中挑取阳性克隆, 单克隆在 LB 培养液中 37 °C 震荡培养 16-20 小时后进行质粒 DNA 的快速提取 (图 1), 并将提取的质粒送北京诺赛基因组研究中心有限公司测序, NCBI 进行 BLAST 结果序列对比分析显示与 DHFR 基因的同源性达到 100 %。

1.2.2 DHFR 重组慢病毒表达质粒的构建

1.2.2.1 DHFR 基因全长的扩增及回收 选用已构建好并测序成功的 DHFR-EZ-T 作为模板, PCR 反应体系: 10* Buffer 2.5 μl, dNTP 1.5 μl, 引物(上) 1 μl, 引物(下) 1 μl, Taq 酶 0.2 μl, 模板 1 μl, ddH₂O up to 25 μl。反应条件: 94 °C 5 min (94 °C 30 sec, 61 °C 30 sec, 72 °C 30 sec) 30 cycles 72 °C 10 min, 4 °C 保存。将产物回收和纯化 (按操作说明书), DHFR 定量。

1.2.2.2 慢病毒表达载体与 DHFR 连接 Bam-HI-HF 及 Hind III 双酶切质粒回收及纯化的 PCR 产物 (图 3), 补平试剂盒补平酶切缺口, 使其成为平末端。PmeI 酶切表达质粒 pWPI, SAP 去磷酸化后回收, 用快速连接试剂盒 T4DNA Polymerase 将补平

后的 DHFR 与磷酸化后的 pWPI 连接, 连接体系 T4 buffer 1 μl, T4 酶 1 μl, DHFR pWPI (浓度比) 7:1, ddH₂O up to 10 μl。16 °C 反应 16h 后将连接产物转化大肠杆菌 DH-5a, 取适量转化后的菌液涂布 AMP(+) 的琼脂糖平板培养基, 37 °C 培养 20-24 小时, 挑选阳性克隆, 分别接种于 3ml AMP(+) 的 LB 中, 37 °C 振荡培养 16-20 小时, 采用 TIANGEN 公司提供的质粒 DNA 提取试剂盒提取质粒 DNA, 将经 RT-PCR 鉴定有目的片段表达的重组质粒送北京诺赛基因组研究中心有限公司测序, 重组质粒的测序引物 Sense 5'tcaagcctcagacagtgttc 3' Anti-sense 5'cgctcgcgtccagctcgaccag 3' NCBI 进行 BLAST 结果序列对比分析显示与 DHFR 基因的同源性达到 100 %。

1.2.3 DHFR 重组慢病毒表达质粒细胞转染 采用 Lipofectamine TM2000 转染试剂盒 (方法按说明书操作) 将 DHFR 重组慢病毒表达质粒 DNA 转染导入 293T 细胞, 转染细胞 48 小时后荧光显微镜下观察荧光表达情况, 并用细胞 RNA 提取试剂盒提取细胞 mRNA, mRNA 逆转录为 cDNA, 293T 细胞中 DHFR 基因表达检测采用 RT-PCR 方法, 引物, 反应体系及条件同上。

2 结果

2.1 EZ-T-DHFR 的构建

1.5 % 琼脂糖凝胶电泳结果显示扩增产物为 625 bp, 符合预期 DHFR cDNA 全长目的条带, 测序结果在 NCBI Blast 上对比分析, 与 DHFR 的同源性达 100 % 结果见图 1、图 2。

2.2 PCR 方法鉴定重组慢病毒质粒 DHFR-pWPI

将在 AMP(+) 的琼脂糖平板培养基 37 °C 培养 20-24 小时后生长的阳性克隆提取的质粒作为模板, 用扩增 pWPI 基因通用引物和 PCR 反应体系及条件进行 PCR 反应, 扩增产物 1.5 % 琼脂糖凝胶电泳, 能够获得 1525 bp 左右的条带的质粒即认为是含有目的基因的重组质粒 (见图 4)

2.3 重组慢病毒质粒的测序结果及分析

将经 RT-PCR 鉴定有目的片段表达的重组质粒送北京诺赛基因组研究中心有限公司测序, 正、反双向测序, 测序结果拼接出完整序列, 在 NCBI 上进行 Blast, 结果显示与 DHFR 的同源性达 100 %。结果见图 5。

2.4 携带重组慢病毒的包装和病毒滴度的测定

三质粒共转染 293T 细胞, LipofectamineTM2000 法转染 293T 细胞后 48 小时, 荧光显微镜下观察 293T 细胞 DHFR 表达情况, 计算转染效率为 80 %-90 %。见图 6。

2.5 RT-PCR 检测 293T 细胞中 DHFR 基因 mRNA 的表达

成功包装表达 DHFR 基因和 GFP 基因的慢病毒 DHFR-pWPI, 收集、浓缩病毒后逐孔稀释滴度测定法测定其滴度为 4×10^5 TU. ml⁻¹, 储存于 -80 °C。结果见图 7。病毒基因组 PCR 证实 DHFR 基因插入, 293T 细胞 DHFR 基因 mRNA 的表达 (+)。结果见图 8。

3 讨论

DHFR 是生物体内较重要的酶, 催化生物体内二氢叶酸还原成四氢叶酸。四氢叶酸是一碳单元的传递体, 它为合成 DNA 生物合成所必须的前体物胸腺嘧啶脱氧核苷的过程提供一碳

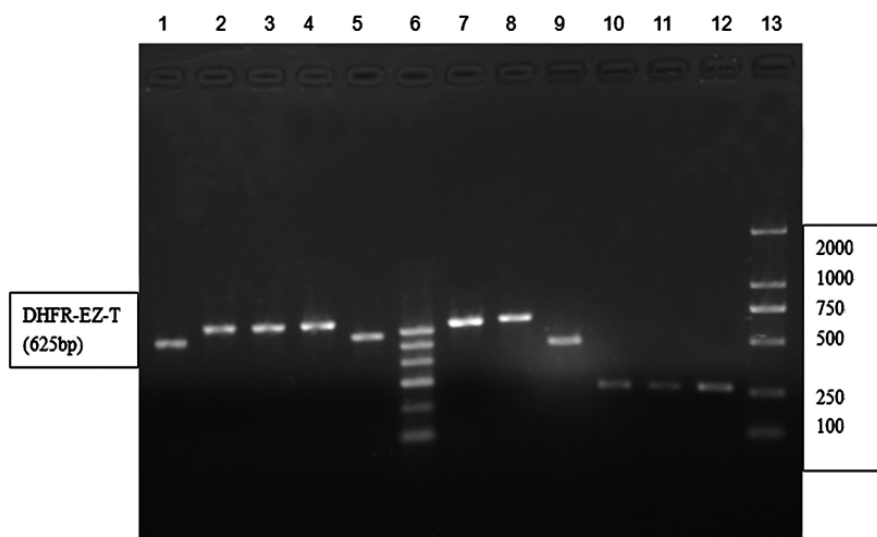


图 1 EZ-T-DHFR 连接质粒凝胶电泳图

2、3、4、7、8:连接上 EZ-T-DHFR 质粒 ; 6:Marker 600 bp(100-600 bp) ; 13:Marker 2000 bp(100-2000 bp)。

Fig. 1 Polymerase chain reaction (PCR) gel imaging electrophoretogram of connected plasmid named EZ-T-DHFR

2,3,4,7,8: connected plasmid named EZ-T-DHFR;6: 600 bp DNA ladder; 13: 2000 bp DNA ladder.

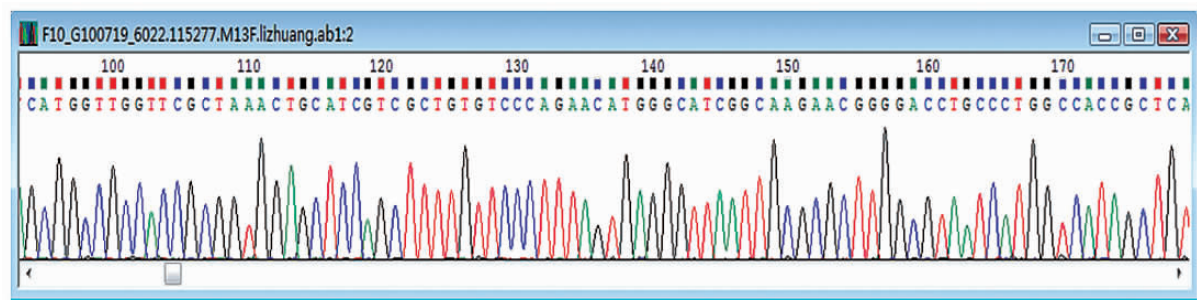


图 2 EZ-T-DHFR 质粒测序峰图

Fig. 2 Sequence mapping of plasmid named EZ-T-DHFR

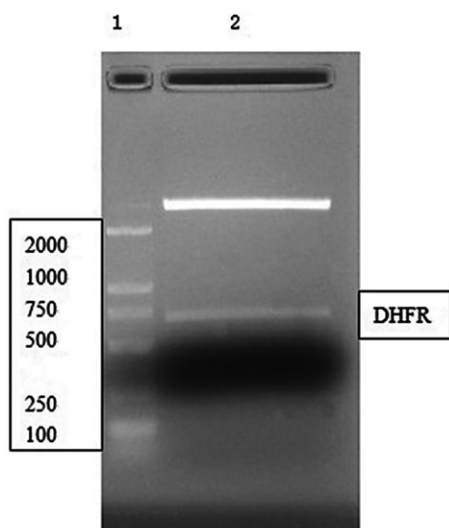


图 3 Bam-HI-HF 及 Hind III 限制性内切酶双酶切 EZ-T-DHFR 质粒图
1:Marker 2000(100-2000 bp); 2:酶切后的条带,由上至下第二条带为目的基因 DHFR 条带。

Fig. 3 DNA recombinant plasmid EZ-T-DHFR digested by Bam-HI-HF and Hind III enzyme

1 2000 bp DNA ladder;2:enzyme digestion stripe, the second stripe from up to down was the target gene DHFR .

单元,参与人体重要的生命物质代谢^[8]。卵巢癌由于其发病隐

匿,早期发现困难,是妇科肿瘤中死亡率高的恶性肿瘤之一,其预后差的主要原因之一是化疗过程中容易产生耐药性。多药耐药是指肿瘤细胞对某一化疗药物产生耐药性后,对其他化学结构及机理不同的化疗药物也产生交叉耐药性。研究表明 MDR 是一个多阶段发展、多因素参与的复杂事件。逆转肿瘤多药耐药是目前肿瘤化疗的研究热点之一^[9]。本课题组先前采用荧光标记差异显示 PCR 法(FDD-PCR)筛选鉴定和验证铂类耐药和非耐药卵巢上皮癌细胞间差异表达基因时也发现铂类耐药和非耐药卵巢上皮癌细胞间 DHFR 存在差异表达,且铂类敏感卵巢上皮癌细胞在体外被诱导成耐药细胞后其 DHFR 表达呈明显上调^[10]。Levy 等^[11]回顾分析 40 例白血病患儿的结果显示二氢叶酸还原酶(DHFR)表达活性与患者的预后相关,通常表达活性增高患者预后差。故在抗肿瘤药物的开发中,和叶酸生物代谢相关的二氢叶酸还原酶(DHFR)是一个重要的药物作用靶点,研发 DHFR 抑制剂成为抗肿瘤药物研究的重要方向,MTX 以及近期临床上使用的新化疗药物培美曲塞的作用靶点就是抑制 DHFR 等代谢酶类而发挥抗肿瘤作用^[12]。目前,癌症的治疗方法越来越多,除了经典的手术、放疗及化疗等几种疗法,基因疗法已逐步用于治疗癌症患者,且疗效明显。而在基因疗法中,选择高效的转基因方法是成功的关键。在本实验研究中,通

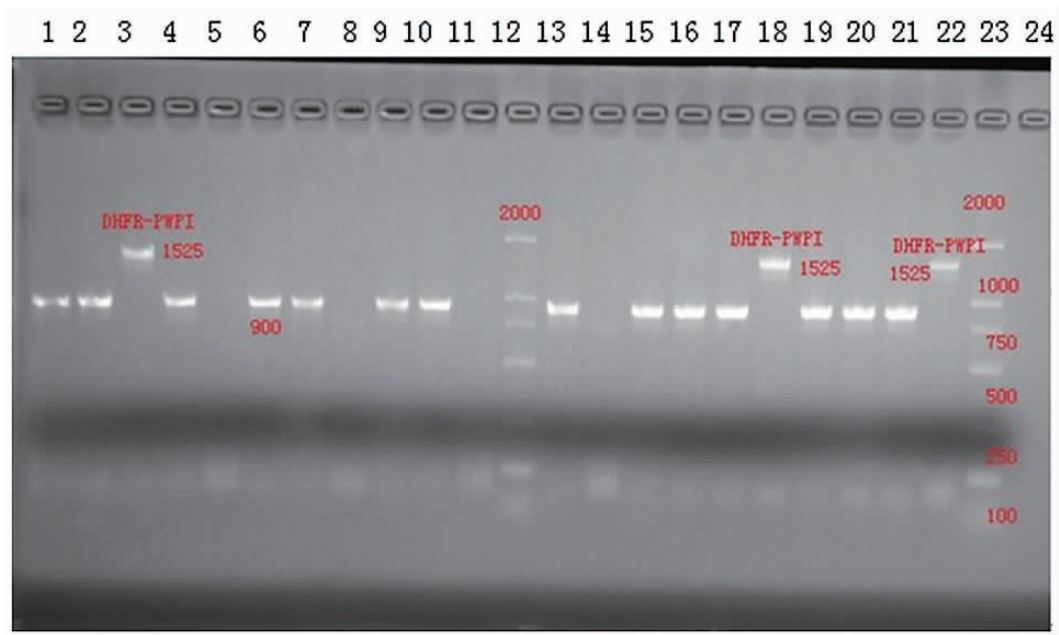


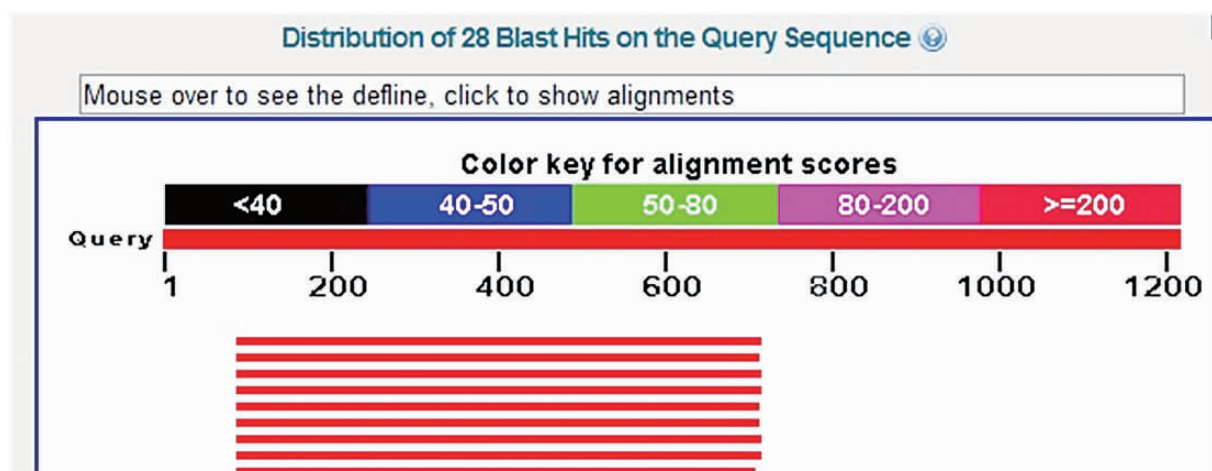
图4 重组慢病毒质粒 DHFR-pWPI 的连接质粒图

12:Marker 2000(100-2000 bp); 3、18、22: DHFR 表达(+)的质粒(1525 bp); 5、8、11、14:无 DHFR 及 pWPI 表达;余下孔均为 pWPI 表达(+)DHFR 表达(-)的质粒(900 bp)。

Fig.4 PCR amplification of recombinant lentivirus plasmid named DHFR-pWPI.12: 2000 bp DNA ladder; 3、18、22: PCR amplification of pWPI vector connected DHFR gene; 5、8、11、14:without the expression of DHFR and pWPI ; others were pWPI CDS sequence amplified by PCR(900 bp).

过构建携带人二氢叶酸还原酶的慢病毒表达载体,将其与包装及包膜质粒共同转染进入 293T 细胞,使 293T 细胞中含有高拷贝的 DHFR 基因,再用于感染目的细胞。慢病毒属于逆转录病毒科,为 RNA 病毒^[13]。慢病毒载体与普通载体比较,具有转移基因片段容量大,不易诱发宿主免疫反应,安全性较好,不仅能感染分裂细胞还能用于感染不分裂细胞,稳定整合于靶细胞的基因组,治疗基因表达时间长等优点^[14],其感染机制是在宿主细胞内以病毒 RNA 为模板在自身反转录酶(RT)的作用下合成 cDNA,再以此 cDNA 为模板合成双链 DNA,经环化后通过病毒整合酶(IN)作用整合在宿主细胞的染色体上并长期表达^[15]。因此,应用慢病毒感染的细胞,可长期稳定的表达目的基因,便于研究目的基因对细胞功能的影响,并且利于进行更进一步的动物实验。慢病毒已成为当前基因治疗中转移载体研究的热点,并被寄予了厚望。pWPI 属于第二代慢病毒载体的载体

质粒,结构中只含有 HIV-1 的 gag、pol、tat 及 rev4 个基因,去除了病毒复制所必须的启动子和增强子,需要与结构质粒 pCMV-dR 8.74 和封套质粒 pMD2.G 一起共转染包装细胞 293T,在 293T 细胞中进行病毒颗粒的重组后进行复制,再感染目的细胞。pWPI 结构上只有一个允许外源性基因插入的克隆位点,在 EMCVIREs 的下游,拥有 EGFP 荧光蛋白基因,可以此作为转染外源性基因后进行筛选的标记。此外, pWPI 含有氨卞青霉素抗性基因,可以借此进行抗性筛选。我们将构建的 DHFR 重组慢病毒载体测序后进行比对,未发现碱基突变现象,将重组载体单独转染 293T 细胞,荧光显微镜下能观察到有绿色荧光蛋白的表达;采用 PCR 检测细胞 mRNA 也发现有 DHFR 基因的表达,证实 DHFR 基因的慢病毒载体成功构建,为进一步的基因靶向治疗研究奠定了基础。



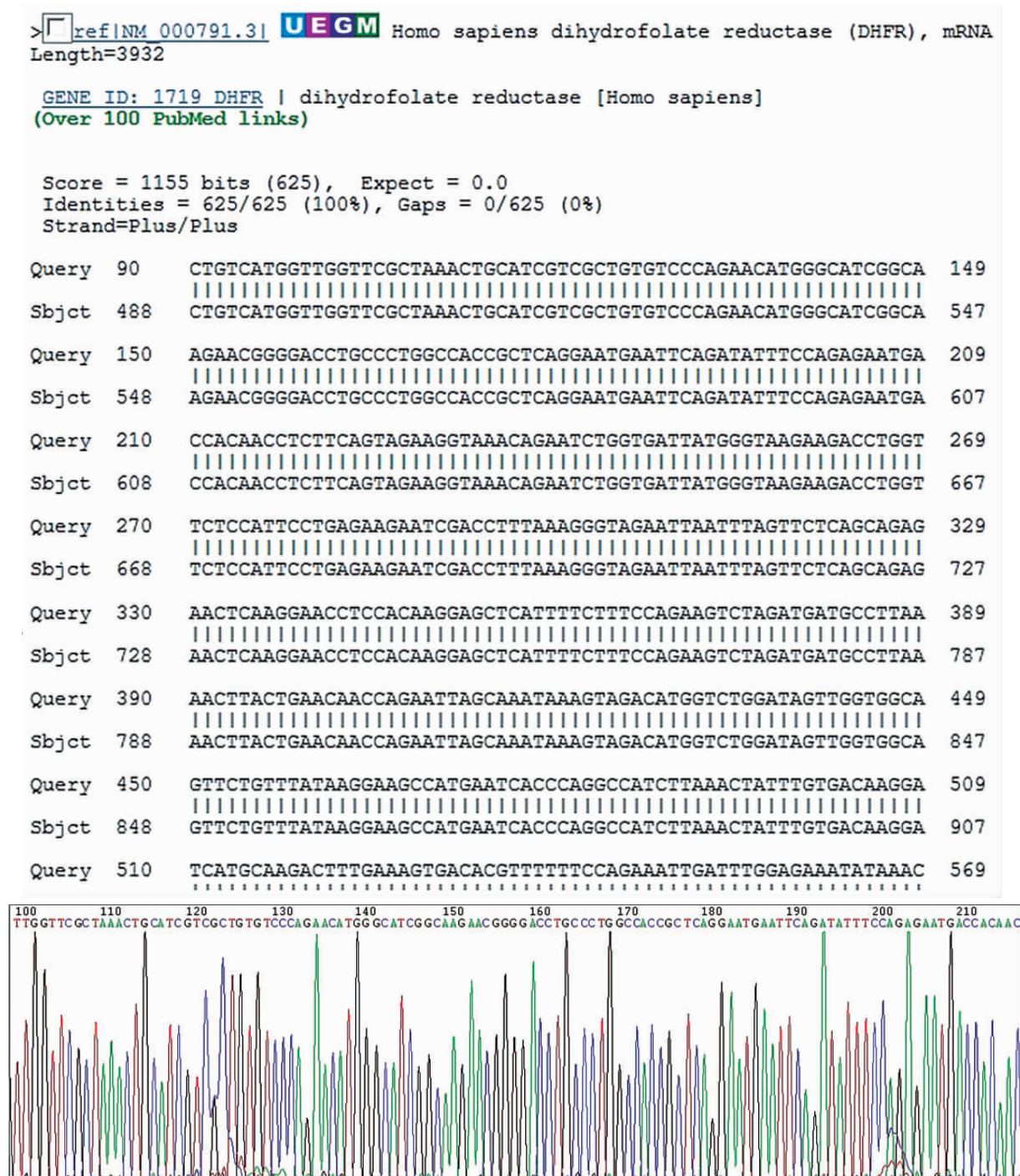


图5 重组慢病毒质粒 DHFR-pWPI 的测序结果图

Fig. 5 Sequence result and sequence mapping of recombinant lentivirus plasmid DHFR-pWPI

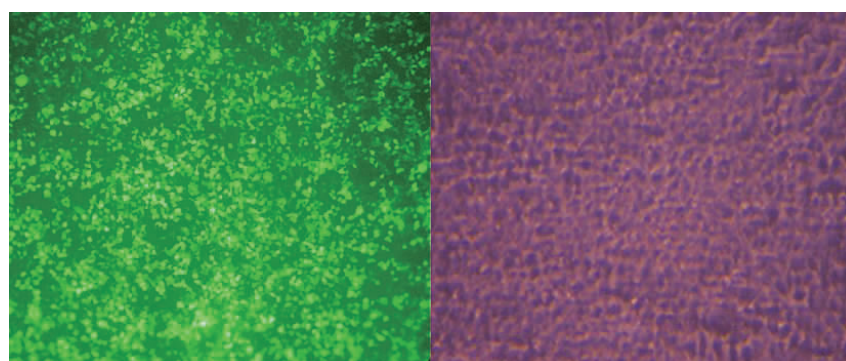
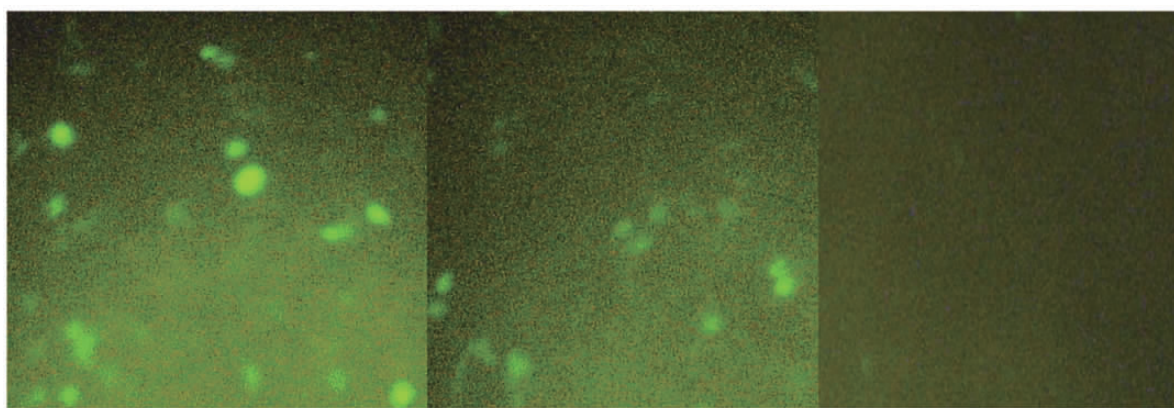


图6 荧光显微镜下观察 293T 细胞 DHFR 表达情况(× 100)

Fig. 6 The expression of DHFR gene in 293T cell under fluorescence microscope(× 100)



1 未稀释病毒液转染镜下观

2 病毒液稀释 8 倍镜下观

3 病毒液稀释 16 倍镜下观

1: Microscopic observation of virus liquid without dilution;

2: Microscopic observation of virus liquid with 8 times dilution;

3: Microscopic observation of virus liquid with 16 times dilution.

图 7 测定病毒滴度

Fig. 7 The detection of virus titer

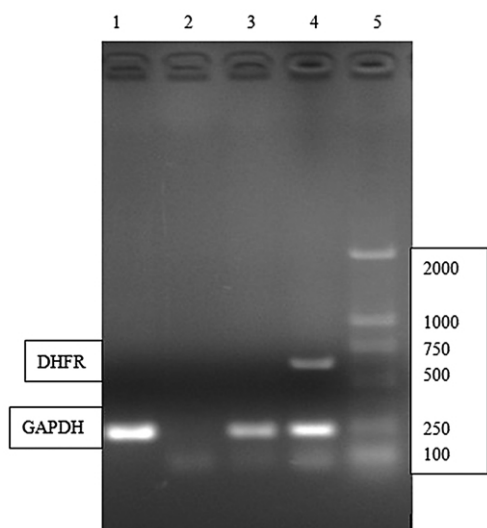


图 8 重组慢病毒感染 293T 细胞 PCR 鉴定

5: Marker2000(100-2000 bp);1:未感染的 293T 细胞;2:阴性对照;3:感染空载体的 pWPI-293T 细胞;4:感染重组慢病毒的 DHFR-pWPI-293T 细胞。

Fig. 8 Expression of DHFR-pWPI in 293T cells was determined by PCR
5 :2000 bpDNA marker ;1: PCR amplification of 293T cell without recombinant virus infection;2:negative control;3: PCR amplification of 293T cell with positive control vector pWPI;4: PCR amplification of 293T cell with recombinant plasmid virus infection.

参考文献(References)

- [1] Gershoni-Baruch R, Dagan E, Israeli D, et al. Association of the C667T polymorphism in the MTHFR gene with breast and/or ovarian cancer risk in Jewish women [J]. Eur J Cancer, 2000, 36 (18): 2313-2316
- [2] Sierra E E, Goldman I D. Recent advances in the understanding of the mechanism of membrane transport of folates and antifolates [J]. Semin Oncol, 1999, 26(2): 11-23
- [3] Galt J R, Halkar R K, Evans C O, et al. In vivo assay of folate

receptors in nonfunctional pituitary adenomas with 99mTc-folate SPECT/CT[J]. J Nucl Med, 2010, 51(11): 1716-1723

- [4] 高海德, 路平, 鲁阳, 等. 双突变二氢叶酸还原酶基因对小鼠的化疗保护作用[J]. 肿瘤, 2006, 28(8): 583-585

Gao Hai-de, Lu Ping, Lu Yang, et al. The chemotherapy protection of double mutations dihydrofolate reduction gene in mouse [J]. Tumor, 2006, 28(8): 583-585(In Chinese)

- [5] Schellens JH, Maliepaard M, Scheper RJ, et al. Transport of topoisomerase I inhibitors by the breast cancer resistance protein. Potential clinical implications [J]. Ann NY Acad Sci, 2000, 922: 188-194

- [6] 于明东, 李书忠. 实时荧光定量 PCR 法检测人骨肉瘤耐 MTX 细胞系中 RFC、DHFR、GST- π 的 mRNA 表达 [J]. 中国矫形外科杂志, 2009, 17(11): 858-861

Yu Ming-dong, Li Shu-zhong. The method of real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (PCR) detects the expression of RFC, DHFR and GST- π mRNA in the skeleton sarcoma drug resistance MTX cells [J]. China orthopaedic surgery, 2009, 17 (11): 858-861 (In Chinese)

- [7] 黄瀚, 李兵, 欧阳林旗, 等. 叶酸受体及二氢叶酸还原酶与人乳腺癌细胞 MCF-7/(ADR) 多药耐药关系[J]. 中国药理学通报, 2011, 27 (1): 99-103

Huang Han, Li Bing, Ou-yang Lin-qi, et al. The relationship of multidrug resistance between folate receptors as well as dihydrofolate reductase and human breast cancer cells MCF-7/(ADR) [J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2011, 27 (1): 99-103(In Chinese)

- [8] Askari BS, Krajcinovic M. Dihydrofolate reductase gene variations in susceptibility to disease and treatment outcomes [J]. Curr Genomics, 2010, 11(8): 578-583

- [9] 董改霞, 洪行球, 黄燕芬. 基因逆转肿瘤多药耐药的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2008, 8(12): 2367-2369

Dong Gai-xia, Hong Xing-qiu, Huang Yan-fen. Progress on Gene Reversal Tumor Multi-drug Resistance [J]. Progress in modern biomedicine, 2008, 8(12): 2367-2369(In Chinese)

(下转第 1910 页)

- [J]. J Trauma, 2004, 56(3): 633-642
- [5] Lu WJ, Li B, Bao NR, et al. Treatment of chronic osteomyelitis with one-stage allograft[J]. Chin J Traumatol, 2006, 9(5): 272-275
- [6] Tulner SA, Schaap GR, Strackee SD, et al. Long-term results of multiple -stage treatment for posttraumatic osteomyelitis of the tibia [J]. J Trauma, 2004, 56(3): 633-642
- [7] Toh CL, Jupiter JB. The infected nonunion of the tibia. Clin Orthop, 1995, 315: 176
- [8] Marsh JL, Prokuski L, Biermann JS. Chronic infected tibia nonunions with bone[J]. Clin Orthop, 1994, 301: 139
- [9] May JW, Jupiter JB, Weiland AJ, et al. Clinical classification of posttraumatic tibial osteomyelitis [J]. J Bone Joint Surg (Am), 1989, 71: 1422
- [10] 李起鸿. 骨外固定原理与临床应用[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1992, 107
- Li Qi-hong. Principle and Clinical application of Bone external fixation [M]. Cheng Du: Sichuan Science and Technology Press, 1992, 107
- [11] 王亦聰. 近年骨折治疗观点的反思[J]. 中华创伤杂志, 1998, 14(1): 1-3
- Wang Yi-cong. Reflection of recent fractures view [J]. Chinese Journal of Trauma, 1998, 14(1): 1-3
- [12] 程富礼, 陈留如, 等. Ilizarov 外固定架肢体延长的临床应用[J]. 中医正骨, 2002, 14(6): 16-17
- Cheng Fu-li, Chen Liu-ru, et al. Ilizarov external fixator in clinical application in body extension [J]. The Journal of Traditional Chinese Orthopedics and Traumatology, 2002, 14(6): 16-17
- [13] Mendel V, Simanowski HJ, Scholz HC, et al. Therapy with gentamicin-PMMA beads, gentamicin-collagen sponge, and cefazolin for experimental osteomyelitis due to Staphylococcus aureus in rats [J]. Arch orthop Trauma Surg, 2005, 125, (6): 363-368
- [14] Beardmore AA, Brools DE, Wenke JC, et al. Effectiveness of local antibiotic delivery with an osteoinductive and osteoconductive bone-graft substitute[J]. J Bone Joint Surg (Am), 2005, 87(1): 107-112
- [15] 袁志, 胡蕴玉, 李明全, 等. 抗感染重组异种骨对兔胫骨髓炎的治疗作用[J]. 中华骨科杂志, 2003, 23(4): 230-234
- Yuan Zhi, Hu Yun-yu, Li Ming-quan, et al. Treatment function of Anti-infective reconstituted bone xenograft in Rabbit tibial osteomyelitis [J]. Chinese Journal of Orthopaedics, 2003, 23(4): 230-234

(上接第 1836 页)

- [10] Li L, Luan Y, Li X, et al. Demonstration of differential gene expression between sensitive and resistant ovarian tumor cells by fluorescence differential display-PCR analysis [J]. Oncol Rep, 2005, 13(5): 793-799
- [11] Levy AS, Sather HN, Steinherz PG, et al. Reduced folate carrier and dihydrofolate reductase expression in acute lymphocytic leukemia may predict outcome: a Children's Cancer Group Study [J]. J Pediatr Hematol Oncol, 2003, 25(9): 688-695
- [12] Webber S, Bartlett CA, Boritzki TJ, et al. AG337, a novel lipophilic thymidylate synthase inhibitor: in vitro and in vivo preclinical studies [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 1996, 37(6): 509-517
- [13] Miyoshi H, Smith KA, Mosier DE, et al. Transduction of human CD34+ cells that mediate long-term engraftment of NOD SCID mice by HIV vectors[J]. Science, 1999, 283(5402): 682-686
- [14] Stewart S A, Dykxhoorn D M, Palliser D, et al. Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells [J]. RNA, 2003, 9(4): 493-501
- [15] 肖高芳, 姚志芳, 贾俊双, 等. 携带人 Oct4 和 EGFP 基因慢病毒表达载体构建[J]. 热带医学杂志, 2010, 10(3): 238-300
- Xiao Gao-fang, Yao Zhi-fang, Jia Jun-shuang, et al. Constructin of A Lentiviral Expression Vector Harboring Human Oct4 and EGFP Genes [J]. J ournal of Tropical Medicine, 2010, 10 (3): 238-300 (In Chinese)