

· 论 著 ·

pEGFP-N₁-BMP₂ 真核表达载体的构建及其经超声微泡介导转染 HPDLFs 后的表达

仲 琳, 钟晓波, 张云燕, 骆书美, Nameeta Shrestha, 齐 进, 李春光
(重庆医科大学附属口腔医院牙体牙髓科 400016)

摘要:目的 构建 pEGFP-N₁-BMP₂ 真核表达质粒, 并检测其经超声微泡转基因技术转染人牙周膜成纤维细胞(HPDLFs) 后的瞬时表达情况。方法 从人胎盘滋养层细胞系中提取总 RNA, 采用 RT-PCR 方法获得目的基因人骨形成蛋白-2(hBMP₂) 基因片段, 连接 pMD19-T 载体并测序正确后与真核荧光表达载体 pEGFP-N₁ 连接, 酶切鉴定后利用超声微泡转基因技术转染入 HPDLFs 中, 通过荧光显微镜和 RT-PCR 检测目的基因在 HPDLFs 中的表达。结果 成功克隆入 BMP₂ 基因, 重组质粒 pEGFP-N₁-BMP₂ 经 PCR 及双酶切鉴定均证实 hBMP₂ 基因已与 pEGFP-N₁ 正确重组。pEGFP-N₁-BMP₂ 经超声微泡转染 HPDLFs 后, 通过绿色荧光观察和 RT-PCR 检测证实 hBMP₂ 能够在体外培养的 HPDLFs 内有效的转录和瞬时表达。结论 成功构建 pEGFP-N₁-BMP₂ 真核表达载体, 通过超声微泡转基因技术成功转染入 HPDLFs 并得到有效表达, 为进一步研究该质粒与超声微泡转基因技术在牙周再生基因治疗中的应用提供实验基础。

关键词: 牙周再生; 超声微泡; 人骨形成蛋白-2; 增强型绿色荧光蛋白; 基因转染; 人牙周膜成纤维细胞

中图分类号: R781.405; R446.61

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)09-1045-03

Construction of eukaryotic expression vector pEGFP-N₁-BMP₂ and its expression in human periodontal ligament fibroblast cells transfected via ultrasound-mediated microbubble destruction

ZHONG Lin, ZHONG Xiao-bo, ZHANG Yun-yan, et al.

(Department of Endodontics, Affiliated Hospital of Stomatology, Chongqing Medical University, Chongqing 400015, China)

Abstract: Objective To construct the recombinant eukaryote plasmid pEGFP-N₁-BMP₂ and to detect its transient expression in HPDLFs transfected by ultrasound-mediated microbubble destruction. **Methods** Total RNA was extracted from human placenta trophoblastic cells. The hBMP₂ cDNA was obtained by RT-PCR and inserted into pMD19-T plasmid. After sequencing the recombinant plasmid pMD19-T-BMP₂, the hBMP₂ cDNA was inserted into the pEGFP-N₁ vector, and then the pEGFP-N₁-BMP₂ vector was identified by double digestion and transfected into HPDLFs by ultrasound-mediated microbubble destruction. Its expression was detected by fluorescent microscopy and RT-PCR. **Results** The hBMP₂ gene fragment was successfully inserted into pEGFP-N₁ and confirmed by restriction endonuclease analysis and DNA sequencing. After the transfection of pEGFP-N₁-BMP₂ into HPDLFs (cultured in vitro) by ultrasound-mediated microbubble destruction, it could be expressed transiently in HPDLFs, which could be confirmed by fluorescent microscopy and RT-PCR. **Conclusion** Recombinant eukaryotic expression vector pEGFP-N₁-BMP₂ can be successfully constructed and transfected into HPDLFs by ultrasound-mediated microbubbles destruction; and the hBMP₂ gene can be expressed successfully in HPDLFs. This basis provides a foundation for further studies in the applications of pEGFP-N₁-BMP₂ and ultrasound microbubble on gene therapy for periodontal regeneration.

Key words: periodontal regeneration; ultrasound microbubble; human bone morphogenetic protein-2; enhanced green fluorescence protein; gene transfection; human periodontal ligament fibroblasts

牙周组织的再生和重建需要特定的生长因子诱导种子细胞的趋化、增殖、分化、细胞外基质合成等。通过转基因技术, 可使目的基因所表达的治疗性蛋白能够在特定区域持续高效表达, 并发挥多方面的调控作用。作者所在课题组的前期研究表明, 超声微泡转基因技术可促进 pEGFP-N₁ 对人牙周膜成纤维细胞(human periodontal ligament fibroblasts, HPDLFs)的转染^[1]。本研究以人骨形成蛋白-2(human bone morphogenetic protein-2, hBMP₂) 为目的基因, 在体外构建真核表达载体 pEGFP-N₁-BMP₂, 通过超声微泡转基因技术转染将其转入 HPDLFs, 观察目的基因的表达情况, 为牙周再生的基因治疗提供一定的实验基础。

1 材料与方

1.1 材料 限制性内切酶 EcoR I 和 BamH I、ExTaq 酶、M-MLV 逆转录酶、T4DNA 连接酶、Bio Marker III、pMD19-T 载体、RNA 提取试剂(Trizol)、RT 反应试剂盒均为 TaKaRa 公司产品, 2×PCR mastermix 为北京天根公司产品, 胶回收、纯化

试剂盒和质粒小量提取试剂盒购自 Omega 公司, 胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司, 酵母提取物、胰蛋白酶、琼脂糖均为上海生物工程技术有限公司(简称上海生工)产品, 上下游引物合成由上海生工完成, 胎盘滋养层细胞 pEGFP-N₁ 载体及大肠埃希菌 DH5α (Escherichia coli DH5α, Ecoli DH5α) 由重庆医科大学生命科学研究院保存。超声基因转染治疗仪和超声微泡造影剂由重庆医科大学超声影像学研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 引物设计合成 以 hBMP₂ 的 cDNA 序列(Gen-Bank, NM001200)为模板, 利用 Primer Premier 5 设计软件, 设计引物, 并在上、下游引物分别引入 EcoR I 和 BamH I 酶切位点。引物序列如下: 上游引物(P1): 5'-CCGGAATTCATGGTGGC-CGGGACCCGCTGTC-3'; 下游引物(P2): 5'-GCGC-CTAGGGGGCGACACCCACAACCCTCCA-3', 以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)基因为内参照, 上游引物 P1: 5'-TGATGA-

CATCAAGAAGGTGGTGAA-3'; 下游引物 P2: 5'-TTCTTG-GAGGCCATGTGGGCCAT-3', PCR 产物为 240 bp, 引物由上海生工合成。

1.2.2 胎盘滋养层细胞总 RNA 的提取 取生长状态良好的原代胎盘滋养层细胞, 参照 Trizol Reagent 的使用说明书提取总 RNA, 而后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 并用分光光度计测浓度。

1.2.3 RT-PCR 扩增目的基因 首先将总 RNA 反转录成 cDNA 第 1 链, 参照 RT 反应试剂盒 10 μ L 体系进行, 反应条件: 37 $^{\circ}$ C 15 min, 85 $^{\circ}$ C 5 s, 4 $^{\circ}$ C 5 min。然后采用 PCR 方法扩增目的基因, 反应体系为: 2 \times PCR mastermix 12.5 μ L, 上下游引物各 1 μ L, RT 产物 2 μ L, 加双蒸水至 25 μ L。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min, 30 个循环后 72 $^{\circ}$ C 充分延伸 10 min。所获 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳。

1.2.4 PCR 产物的纯化与回收 PCR 产物经 0.8% 琼脂糖进行胶回收, 按 DNA 回收试剂盒说明书进行, 回收约 1.2 kb 的目的片段。回收后按 DNA 纯化试剂盒说明书进行, 纯化目的基因。

1.2.5 pMD19-T-BMP₂ 克隆质粒的构建 将以上回收纯化的 PCR 产物克隆入 pMD19-T 载体中, 反应体系: 回收纯化的 PCR 产物 4.5 μ L, pMD19-T 载体 1 μ L, 含有 T4DNA 连接酶的缓冲液 5.0 μ L, 混匀后在 16 $^{\circ}$ C 下反应过夜。然后将连接产物转化 DH5 α 感受态细菌, 将转化菌于含 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 固体培养基上, 同时以空质粒与 ddH₂O 对照, 37 $^{\circ}$ C 培养约 16~18 h, 随机挑取生长良好菌落 20 个于 37 $^{\circ}$ C 下 200 r/min 振荡培养过夜。取 1 μ L 菌液进行 PCR 初筛鉴定, 以 1 200 bp 位置出现明显的特异片段为阳性克隆, 采用质粒小抽试剂盒提取质粒, 进行下一步双酶切鉴定。酶切体系: pMD19-T-BMP₂ 10 μ L, EcoR I 1 μ L, BamH I 1 μ L, 通用缓冲液 buffer 2 μ L, ddH₂O 6 μ L, 总体积为 20 μ L, 混匀后 37 $^{\circ}$ C 水浴 6 h, 取酶切产物 5 μ L, 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 选取阳性克隆送往大连宝生物工程有限公司进行序列测定。

1.2.6 pEGFP-N₁-BMP₂ 真核表达载体的构建 分别提取上述经测序鉴定正确的克隆质粒 pMD19-T-BMP₂ 与 pEGFP-N₁, 用 EcoR I 与 BamH I 内切酶进行双酶切, 酶切体系如下: pMD19-T 质粒 10 μ L, EcoR I 1 μ L, BamH I 1 μ L, 通用缓冲液 buffer 2 μ L, ddH₂O 6 μ L, 总体积为 20 μ L; pEGFP-N₁ 质粒 10 μ L, EcoR I 1 μ L, BamH I 1 μ L, 通用缓冲液 2 μ L, ddH₂O 6 μ L, 总体积为 20 μ L; 将上述酶切产物分别按照 DNA 纯化试剂盒说明书进行纯化, 将酶切纯化的目的基因和 pEGFP-N₁ 按以下体系在 16 $^{\circ}$ C 过夜反应。连接体系: 10 \times T4DNA 连接酶缓冲液 2.5 μ L, DNA 片段 0.3 pmol, 载体 DNA 0.03 pmol, T4DNA 连接酶 1 μ L, ddH₂O 补足 25 μ L。连接后转化 DH5 α 感受态细菌。分别按照菌落 PCR 鉴定、酶切鉴定和测序鉴定来筛选阳性克隆。将筛选到的阳性克隆命名为 pEGFP-N₁-BMP₂。

1.2.7 细胞的培养和鉴定 组织块法原代培养 HPDLFs 并传代。取第 3 代培养的 HPDLFs 细胞爬片, 丙酮固定, 吹干, 常规 ABC 免疫组织细胞化学法进行波形丝蛋白抗体和角蛋白抗体染色鉴定, 传代后取 3~5 代细胞用于实验。

1.2.8 超声微泡介导 pEGFP-N₁-BMP₂ 转染 HPDLFs 后以绿色荧光检测目的基因的表达 取 3~5 代的 HPDLFs 按 1.5 \times 10⁵ 浓度加入 24 孔培养板内(每间隔一孔传代, 以免超

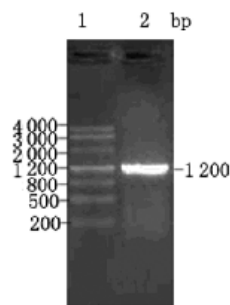
声探头发射超声时可能带来邻间孔的影响)。置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱培养 24 h, 当细胞达 70%~80% 时, 换入无血清、无抗生素的 DMEM 培养液 200 μ L, 每孔加入质粒 1 μ g, 终浓度为 15% 的微泡, 在频率为 1 MH、声强为 0.5 W/cm² 条件下, 通过超声仪探头用耦合剂经培养板底部, 依次辐照每孔细胞, 间断波幅照射时间为 60 s, 同时以未转染组和转染空质粒 pEGFP-N₁ 组作对照, 每组转染 5 孔, 置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱培养 4~6 h, PBS 洗涤后, 每孔再加入 200 μ L 含 20% 的胎牛血清的 DMEM 培养液, 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱继续培养, 48 h 后在荧光显微镜下观察荧光蛋白的表达情况。

1.2.9 以 RT-PCR 检测目的蛋白的表达 将转染后的各组培养细胞在 48 h 后分别提取总 RNA, 取 2 μ L RNA 按上述体系和条件反转录成 cDNA 第一链, 随后进行 PCR 扩增, 同时以 GAPDH 作为内参照, 反应体系为: 2 \times PCR mastermix 12.5 μ L, BMP₂ 上下游引物各 1 μ L, GAPDH 上下游引物各 1 μ L, RT 产物 2 μ L, 加双蒸水至 25 μ L, 反应条件同上。PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳。

2 结果

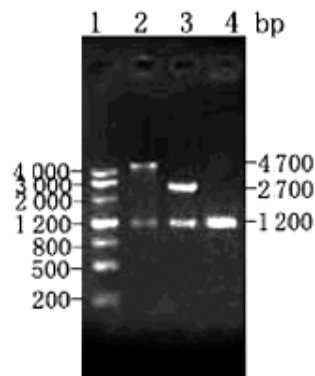
2.1 胎盘滋养层细胞总 RNA 含量测定及纯度分析 经分光光度计检测, 所提总 RNA 浓度约为 0.636 μ g/ μ L, OD260/OD280 为 1.961, 1% 琼脂糖凝胶电泳可见沉降系数(S)为 28S、18S 和 5S 3 个条带, 清晰且拖尾轻, 说明所提 RNA 质量和丰质均较高。

2.2 RT-PCR 扩增目的基因 以人胎盘滋养层细胞总 RNA 为模板, RT-PCR 扩增, 其产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 在 1 200 bp 左右有特异性扩增条带, 大小与预期相符合, 提示扩增产物为 BMP₂ 基因片段(图 1)。



1: Bio Marker III; 2: hBMP₂。

图 1 RT-PCR 产物的 1% 琼脂糖凝胶电泳



1: Marker; 2: pEGFP-N₁-BMP₂ 双酶切产物; 3: pEGFP-N₁ 双酶切产物; 4: hBMP₂ PCR 产物。

图 2 重组质粒双酶切及 PCR 鉴定

2.3 重组质粒 pMD19-T-BMP₂ 和 pEGFP-N₁-BMP₂ 的鉴定

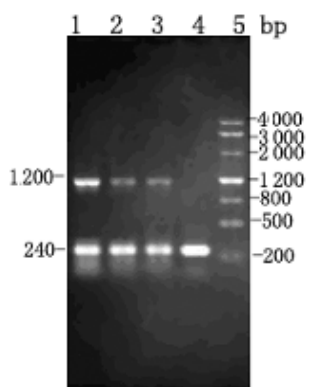
2.3.1 重组质粒的双酶切及 PCR 鉴定 重组质粒 pMD19-T-BMP₂ 经 EcoR I 和 BamH I 双酶切后 1% 琼脂糖凝胶电泳可见约 1 200 bp 和 2 700 bp 出现条带, 与 BMP₂ (1 190 bp) 和 pMD19-T 载体 (2 692 bp) 大小相符。构建的真核表达载体 pEGFP-N₁-BMP₂ 质粒经 EcoR I 和 BamH I 双酶切后 1% 琼脂糖凝胶电泳, 可见约 1 200 bp 和约 4 700 bp 出现条带, 与 BMP₂ (1 190 bp) 和 pEGFP-N₁ 载体 (4 700 bp) 大小相符, 且双酶切后的 BMP₂ 条带与 RT-PCR 扩增后产物电泳带处于相同位置, 酶切鉴定结果显示重组质粒 pEGFP-N₁-BMP₂ 构建成功 (图 2)。

2.3.2 pEGFP-N₁-BMP₂ 的 DNA 序列分析 测序结果校对后经 BLAST 软件分析, 其核酸序列与 Gene Bank 中 hBMP₂ 的 mRNA 序列 (NM001200) 的编码序列同源性完全相符, 进一步证实本实验所克隆的基因为 hBMP₂。

2.4 HPDLFs 形态学观察与鉴定 倒置相差显微镜下观察 HPDLFs 呈长梭形或星形, 胞体丰满, 胞浆均匀, 细胞椭圆形居中, 核仁清晰 2~3 个 (封 3 图 3)。免疫组化染色显示波形丝蛋白抗体染色阳性 (封 3 图 4), 细胞胞浆棕黄色着色, 角蛋白抗体染色阴性, 证实该细胞为中胚层来源。

2.5 经超声微泡转染后 pEGFP-N₁-BMP₂ 表达的荧光观察 转染 48 h 后在荧光显微镜下观察, pEGFP-N₁-BMP₂ 转染组可见到发绿色荧光的细胞 (封 3 图 5)。而未转染组没有见到荧光细胞。提示 pEGFP-N₁-BMP₂ 经超声微泡转染后在 HPDLFs 中有表达。

2.6 RT-PCR 检测目的基因的表达 转染 48 h 后 3 组细胞提总 RNA 后进行 RT-PCR 反应, 结果显示 3 组均能扩增出 1 200 bp 条带, 其中 pEGFP-N₁-BMP₂ 转染组条带较清晰, pEGFP-N₁ 转染组和未转染组扩增出的条带亮度明显低于 pEGFP-N₁-BMP₂ 转染组。说明超声微泡能介导 pEGFP-N₁-BMP₂ 对 HPDLFs 的转染, 并能加强 hBMP₂ 在 HPDLFs 中的表达 (图 6)。



1: pEGFP-N₁-BMP₂ 转染组; 2: pEGFP-N₁ 转染组; 3: 未转染组; 4: 内参; 5: Marker。

图 6 RT-PCR 检测目的基因的表达

3 讨论

近年来以生长因子局部应用为代表的牙周再生治疗受到广泛关注和研究^[2-5]。生长因子是一类存在于体内具有多种调节功能的生物活性因子, 大多是蛋白质或生物活性肽, 半衰期较短, 局部直接使用时存在着易流失、效率低等问题, 所以需要反复大剂量使用才能实现其对种子细胞的调控作用, 另外作为外源性蛋白植入体内还可能会引起毒性和免疫反应等^[6]。局部基因治疗将编码某种生长因子的基因利用转基因技术导入恰当的靶细胞内, 通过基因表达过程, 使目的基因所表达的

长因子能够在特定区域持续高效表达, 并在局部产生微环境发挥更强大的调控功能^[7], 从而避免了外源性生长因子直接应用的弊端, 为牙周再生治疗提供了广阔的应用前景。

骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic proteins, BMPs) 广泛存在于人体多种组织和细胞内, 是骨组织形成过程中的多效分子调节器, 在 BMPs 家族中以 BMP₂ 目前研究最为广泛, 诱导成骨活性最强^[8]。已有研究表明, BMP₂ 定位于具有成骨倾向的细胞胞浆中, 能够诱导牙周组织中未分化间充质细胞分化为成牙骨质细胞和成骨细胞。转基因技术的应用可以使外源性的 BMP₂ 直接在宿主主体内完成表达和后加工, 进而使内源性合成的 BMP₂ 与细胞内的膜受体有效结合, 发挥更大的生物学活性^[9-10], 从而实现诱导局部骨组织形成的功效。

真核表达载体 pEGFP-N₁ 复制能力强, 具有多克隆位点, 便于目的基因的插入, 含有高效且功能强大的启动子 SV40 和 PCMV, 可以使目的基因在增殖的细胞中稳定表达。其编码的增强型绿色荧光蛋白 (pEGFP) 是一种优化的突变型 GFP, 产生的荧光较普通 GFP 强 35 倍, 大大增强了其报告基因的敏感度。具有检测方便、荧光稳定、无细胞毒性、不影响融合蛋白的表达和生物活性等优点^[11-13]。由于 ExTaq 酶具有不依赖于模板的 3' 端加 "A" 活性, 所以 PCR 扩增的目的片段会在 3' 端加上 "A" 尾, 与商品化的 pMD19-T 载体上的 "T" 尾结合后形成单个碱基互补的突出端, 因而不需将产物和载体酶切, 可直接克隆到 T 载体上, 提高插入基因片段与载体的连接效率。本实验采用 RT-PCR 方法获得目的基因 hBMP₂, 先将 PCR 产物克隆到 pMD19-T 载体上, 测序正确后与真核荧光表达载体 pEGFP-N₁ 连接, 成功构建 pEGFP-N₁-BMP₂ 真核表达载体。

现已有大量研究表明, 超声介导微泡造影剂破裂可使其周围的组织细胞壁和质膜被击穿, 产生可逆性或不可逆性小孔, 从而使目的基因容易进入组织细胞内, 实现并增强基因的转染和表达^[14-16]。本研究利用超声微泡转基因技术在前期研究已筛选的转染参数下, 将带有目的基因的真核表达载体 pEGFP-N₁-BMP₂ 成功转染入 HPDLFs。通过 RT-PCR 从 mRNA 水平检测转染 pEGFP-N₁-BMP₂ 后 HPDLFs 中 hBMP₂ 的瞬时表达, 结果显示正常 HPDLFs 中 BMP₂ 的表达量较少, 而经超声微泡转染 pEGFP-N₁-BMP₂ 后 BMP₂ 的表达量明显增多, 提示该转基因技术可促进基因的瞬时表达。这为进一步研究该质粒与超声微泡转基因技术在牙周再生基因治疗中的应用提供一定的实验基础。有关转染后蛋白持续表达的时间、以及表达量的确定还有待进一步研究。

参考文献:

[1] 张云燕, 李有强, 骆书美, 等. 超声微泡介导 pEGFP-N₁ 质粒转染人牙周膜成纤维细胞的实验研究[J]. 中华医学影像技术, 2009, 25(3): 159.

[2] 唐昊喆, 王勤涛, 董广英, 等. pIRES2-EGFP-hBMP₂ 载体的构建及对人牙齦成纤维细胞表型的影响[J]. 第四军医大学学报, 2007, 28(16): 1497.

[3] Kunze M, Huber A, Krajewski A, et al. Efficient gene transfer to periodontal ligament cells and human gingival fibroblasts by adeno-associated virus vectors[J]. J Dent, 2009, 37(7): 502.

[4] Anusaksathien O, Giannobile WV. Growth factor delivery to re-engineer periodontal tissues[J]. Curr Pharm Biotechnol, 2002, 3(2): 129.

愈来愈多的研究表明,骨髓瘤细胞无序增殖与细胞凋亡紊乱密切相关^[9]。本研究结果发现,非药物处理组骨髓瘤细胞凋亡率明显较药物处理组低,进一步说明凋亡异常是骨髓瘤发病的重要原因。本实验中经 β -榄香烯处理后骨髓瘤细胞 RPMI-8226 增殖显著受抑,为明确其原因,本研究采用流式细胞术检测 β -榄香烯对骨髓瘤细胞凋亡的影响,结果发现:10 μ mol/L 组的凋亡率已较对照组有明显增加;随着 β -榄香烯浓度增加,药物组骨髓瘤细胞凋亡率递增,提示 β -榄香烯可诱导体外培养的骨髓瘤细胞 RPMI-8226 凋亡。同时 Hoechst33342/PI 双染细胞形态学观察亦发现,不同浓度 β -榄香烯处理组镜下均出现凋亡细胞,可见典型凋亡形态学改变,进一步证实 β -榄香烯可通过诱导人骨髓瘤细胞 RPMI-8226 凋亡,抑制其增殖。其作用机制可能与下列因素有关:(1) β -榄香烯增加细胞内氧自由基(如: H_2O_2)产生,启动细胞凋亡^[5];(2) β -榄香烯影响凋亡相关基因表达,激活凋亡最终执行者——Caspase 家族^[10];(3) β -榄香烯改变线粒体膜电位和细胞内 Ca^{2+} 浓度,启动内源性细胞凋亡机制^[5]。

本研究结果表明, β -榄香烯可阻滞骨髓瘤细胞生长周期,激活细胞凋亡通路,导致体外培养的人骨髓瘤细胞 RPMI-8226 增殖抑制。尽管其具体机制及体内疗效尚有待于进一步研究说明,但结合 β -榄香烯在长期临床应用中表现出的高效、低毒、廉价等特点,提示 β -榄香烯在骨髓瘤临床治疗中有广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] Dmoszynska A. Diagnosis and the current trends in multiple myeloma therapy[J]. *Pol Arch Med Wewn*, 2008, 118(10):563.
- [2] Peng X, Zhao Y, Liang X, et al. Assessing the quality of RCTs on the effect of beta-elemene, one ingredient of a Chinese herb, against malignant tumors[J]. *Contemp Clin Trials*, 2006, 27(1):70.
- [3] Yao YQ, Ding X, Jia YC, et al. Anti-tumor effect of beta-elemene in glioblastoma cells depends on p38 MAPK activation[J]. *Cancer Lett*, 2008, 264(1):127.
- [4] Zhao J, Li QQ, Zou B, et al. In vitro combination characterization of the new anticancer plant drug beta-elemene with taxanes against human lung carcinoma[J]. *Int J Oncol*, 2007, 31(2):241.
- [5] Yu Z, Wang R, Xu L, et al. N-(beta-Elemene-13-yl) tryptophan methyl ester induces apoptosis in human leukemia cells and synergizes with arsenic trioxide through a hydrogen peroxide dependent pathway [J]. *Cancer Lett*, 2008, 269(1):165.
- [6] Lima M, Teixeira Mdos A, Fonseca S, et al. Immunophenotypic aberrations, DNA content, and cell cycle analysis of plasma cells in patients with myeloma and monoclonal gammopathies[J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2000, 26(6):634.
- [7] Sun Y, Liu G, Zhang Y, et al. Synthesis and in vitro antiproliferative activity of beta-elemene monosubstituted derivatives in HeLa cells mediated through arrest of cell cycle at the G1 phase[J]. *Bioorg Med Chem*, 2009, 17(3):1118.
- [8] Alenzi FQ. Links between apoptosis, proliferation and the cell cycle[J]. *Br J Biomed Sci*, 2004, 61(2):99.
- [9] 陈幸华. 血液肿瘤治疗的现状与前景[J]. *重庆医学*, 2003, 32(10):1281.
- [10] Li QQ, Wang G, Zhang M, et al. beta-Elemene, a novel plant-derived antineoplastic agent, increases cisplatin chemosensitivity of lung tumor cells by triggering apoptosis [J]. *Oncol Rep*, 2009, 22(1):161.
- [1] (上接第 1047 页)
- [5] 杨宓, 邓锋, 李勇, 等. 转化生长因子 β_1 在下颌压缩成骨过程中的表达研究[J]. *重庆医学*, 2008, 37(11):1189.
- [6] Kaigler D, Cirelli JA, Giannobile WV. Growth factor, delivery for oral and periodontal tissue engineering[J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2006, 3(5):647.
- [7] 徐卫东, 赵建国. 骨缺损的局部基因治疗[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007, 11(10):1992.
- [8] Akin MS, Einhorn TA. Recombinant human bone morphogenetic proteins in the treatment of fractures[J]. *Foot Ankle Clin*, 2005, 12(4):639.
- [9] Nakashima M, Reddi AH. The application of bone morphogenetic proteins to dental tissue engineering[J]. *Nat Biotechnol*, 2003, 21:1025.
- [10] 邵长艳, 吴钦贞, 姜广水, 等. pIRES-BMP₂ 治疗牙髓暴露的实验研究[J]. *山东医药*, 2005, 45(1):23.
- [11] Tourriere H, Chebli K, Zekri L, et al. The Ras GAP-associated en-doribonuclease G3BP assembles stress granules [J]. *J Cell Biol*, 2003, 160(6):823.
- [12] 徐忠焯, 程远, 朱晓峰, 等. 携带 IRES 的 hBDNF 绿色荧光蛋白表达载体的构建和鉴定[J]. *重庆医学*, 2008, 37(10):1057.
- [13] 陈芳琳, 陈正堂. 绿色荧光蛋白基因标记的肺癌细胞株的建立[J]. *重庆医学*, 2007, 36(19):1938.
- [14] Kimmel E. Cavitation bioeffects [J]. *Crit Rev Biomed Eng*, 2006, 34(2):105.
- [15] Shen ZP, Brayman AA, Chen L, et al. Ultrasound with microbubbles enhances gene expression of plasmid DNA in the liver via intraportal delivery[J]. *Gene Ther*, 2008, 15(16):1147.
- [16] Porter TR. The utilization of ultrasound and microbubbles for therapy in acute coronary syndromes[J]. *Cardiovasc Res*, 2009, 83(4):636.

(收稿日期:2009-08-24 修回日期:2009-10-20)

(收稿日期:2009-09-09 修回日期:2009-10-20)