

[文章编号] 1007-385X(2006)04-0296-05

eGFP 标记肿瘤细胞小鼠模型的建立与应用

江千里^{1,2}, 王健民¹, 江 汕², 温丽敏¹, 胡晓霞¹, 周 虹¹, 许小平¹(1. 第二军医大学长海医院血液科, 上海 200433; 2. 南方医科大学南方医院, 广州 510505)

[摘要] **目的:** 以携带绿色荧光蛋白基因(*eGFP*)的重组逆转录病毒(RV)标记肿瘤细胞, 建立小鼠体内长期、系统肿瘤细胞研究模型, 并初步探讨其应用。**方法:** 制备高滴度*eGFP*-RV, 感染小鼠白血病P388细胞, 有限稀释法获得*eGFP*⁺的单细胞克隆; 在体外和DBA/2小鼠体内, 分别以流式细胞术、荧光倒置显微镜、冰冻切片和普通病理切片、半固体集落培养和PCR等方法, 观察小鼠体内*eGFP*标记肿瘤细胞的效率、定位和时效。**结果:** *eGFP*基因导入率达80.2%, 经克隆筛选后*eGFP*⁺率>99.2%。P388-*eGFP*细胞体外传代3个月后*eGFP*⁺率为95.2%, 体内序贯接种(56.3±1.25)d后*eGFP*⁺率为(93.3±0.50)%(*n*=3)。*eGFP*基因导入未影响P388细胞的体内外生物学特性。多聚甲醛灌注固定法和液氮速冻法可有效保存组织中的荧光, 灌注固定法制备的标本适用于多种病理和组化染色观察; 外周血、肝、脾、脑等脏器中*eGFP*⁺细胞的分布、增殖, 可用流式细胞仪和荧光显微镜等动态、定量观察, 并可通过外周血的荧光细胞变化动态观察肿瘤细胞对治疗的反应; 无菌获得的*eGFP*⁺细胞可用于体外培养或体内序贯移植; PCR等技术可提高微量肿瘤细胞检测的敏感性。**结论:** 成功建立的模型可在体内外以多种方法长期、动态、敏感地追踪观察荧光标记的肿瘤细胞, 可广泛应用于肿瘤和细胞组织工程等领域。

[关键词] 绿色荧光蛋白; 基因标记; 动物模型; 逆转录病毒载体; 灌注固定

[中图分类号] Q78; R457.2

[文献标识码] A

Establishment and application of *eGFP* gene marked tumor cells model in murine

JIANG Qian-li¹, WANG Jian-min¹, JIANG Shan², WEN Li-min¹, HU Xiao-xia¹, ZHOU Hong¹, XU Xiaoping¹(1. Department of Hematology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Nanfang Hospital, Nanfang Medical University, Guangzhou 510515, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an *eGFP*-gene-marked tumor cells model in murine for long-term *in vivo* research and to study its preliminary application. **Methods:** High titer *eGFP* retrovirus (RV) was prepared and was used to transfect mouse leukemia cells—P388 cells. P388-*eGFP* clones were obtained by limited dilution method. Wild type P388 (wtP388) was used as control; DBA/2 mice were inoculated with P388-*eGFP* abdominally or intravenously (*n*=10). *eGFP*⁺ cells from abdominal cavities or bone marrow of the dyed mice were used to inoculate new mice. *eGFP*⁺ P388 cells were studied in different tissues by Flow cytometry (FCM), semi-solid culture, fluorescence microscope, light microscope and PCR, etc. **Results:** It was found that 80.2% P388 cells were *eGFP*⁺ 48 h after retrovirus transfection. P388-*eGFP* clone selection increased the *eGFP*⁺ rate to 99.2%, and the rate remained at 95.2% after 3 months' passaging. After inoculation in abdominal cavities for (56.3±1.25) d, the *eGFP*⁺ rate of P88-*eGFP* cells increased to (93.3±0.50)% (*n*=3). *eGFP* gene marking had no influence on the bioactivity of P388 cells. Paraformaldehydum and liquid nitrogen both effectively protected the fluorescence signals in the tissues. Perfusion fixation method was suitable for various kinds of pathological observation approach. FCM could be used to observe *eGFP*⁺ cells in the bone marrow, liver, spleen, thymus, peripheral blood, ascitic fluid, etc. The dynamic changes of *eGFP*⁺ cells could reflect the response of tumor cells to treatment. *eGFP*⁺ cells could be used for *in vitro* culture and *in vivo* transplantation. PCR is sensitive in detecting *eGFP*⁺ tumor cells in tissues. **Conclusion:** The present model allows for long-term, dynamic and sensitive tracing of fluorescence-labeled cells *in vivo*, and can be widely used in tumor and cell engineering research.

[基金项目] 国家自然科学基金(30172347);上海市卫生系统百名跨世纪优秀学科带头人培养计划基金(98 BR029)

[作者简介] 江千里(1974-),男,浙江温岭人,博士,主治医师,主要从事血液病诊治的研究

[通讯作者] 王健民, E-mail: jmwang@medmail.com.cn

[**Key words**] green fluorescence protein, gene marking, animal model, retrovirus vector, perfusion fixation

[Chin J Cancer Biother, 2006, 13(4): 296-300]

在肿瘤、免疫和组织细胞工程等研究中,需要长期观察各种靶细胞在体内的定殖、迁移,以及各种干预因素导致的变化。基因标记是体内外有效识别靶细胞的好方法。绿色荧光蛋白基因(*GFP*)作为新型标记基因具有敏感、简便、低毒等特点^[1]。国内外,*GFP*用于基因标记的文献越来越多。随着红色荧光基因(*RFP*)、黄色荧光蛋白(*YFP*)基因等*GFP*变构体的出现,以不同荧光基因标记同时研究多种细胞也成为可能^[2]。然而,*GFP*基因标记的应用亦有其特点和局限性,系统研究在国内尚不多。本课题建立了可系统、简便、敏感地进行*GFP*基因标记肿瘤细胞长期体内观察的小鼠模型,在肿瘤、免疫、细胞工程等研究领域有良好的应用前景。

1 材料与方法

1.1 试剂、细胞及动物

DMEM培养液购自Gibco BRL公司,新生牛血清(NBS)购自杭州四季青公司,聚凝胺(polybrene)、电泳用琼脂糖和甲基纤维素购自Sigma公司,preMix-PCR试剂盒购自TAKARA生物工程公司,细胞基因组DNA抽提试剂盒购自华舜生物工程公司。OCT包被液购自美国Miles公司。逆转录病毒(RV)载体MSCV-*eGFP*及Phoenix E逆转录病毒包装细胞由美国匹兹堡大学程涛教授惠赠。携带内部核糖体进入位点(IRES)的RV载体,(MSCV-YCD-IRES-*eGFP*)由本室张雨生博士后构建,IRES可诱导YCD和*eGFP*基因同时表达。小鼠白血病细胞株P388和NIH3T3细胞由本室保存和传代。DBA/2小鼠购自中国科学院上海实验动物中心,6~8周龄,雌性,饲养于无特殊病原体(SPF)环境。

1.2 细胞培养

如非特殊说明,细胞在37℃、5% CO₂、100%饱和湿度条件下,培养于10% NBS的DMEM中,实验用细胞均处于对数生长期。

1.3 逆转录病毒的制备

以磷酸钙沉淀法^[3]将质粒导入Phoenix E包装细胞,制备MSCV-*eGFP*和MSCV-YCD-IRES-*eGFP*的RV。以NIH3T3细胞为靶细胞,批量快速病毒滴度测定法(LaSRT)测定病毒滴度^[4],病毒滴度为(4.0 ± 2.0) × 10⁶ TU/ml。

1.4 基因的导入和克隆筛选

采用离心感染法^[5]或流动转染法^[6]将基因高效导入P388细胞。以流式细胞仪(BD公司,FACS Cabi-

lum)检测*eGFP*⁺细胞比例。以改良有限稀释法^[7]在荧光倒置显微镜(Olympus IX70)下获得*eGFP*⁺克隆的P388-*eGFP*和P388-YCD-*eGFP*。

1.5 *eGFP*基因导入对细胞特性的影响

以野生型P388细胞为对照,观察P388-*eGFP*和P388-YCD-*eGFP*细胞的形态、生长曲线,长期体外传代后测定细胞的*eGFP*⁺表达率。DBA/2小鼠分别经腹腔接种P388-*eGFP*(*eGFP*组)、P388-YCD-*eGFP*(YCD组)和P388细胞(空白对照组),5 × 10⁶细胞/只(*n* = 5),比较细胞的致病性^[8]。从濒死小鼠腹腔获得的腹水细胞经计数和FACS检测后,再以1 × 10³细胞/只,序贯移植入下一批小鼠腹腔,观察长期体内接种对细胞荧光表达率的影响(*n* = 3)。

1.6 *eGFP*标记细胞体内研究模型的制备

DBA小鼠16只,随机分为2组;分别经尾静脉接种P388-*eGFP*细胞及P388-YCD-*eGFP*,5 × 10⁶细胞/只,当日计为d0,24 h后开始经腹腔给予5-氟胞嘧啶(5-FC)5 μmol/d,根据小鼠外周血荧光细胞检测结果,第8天开始将5-FC加量至20 μmol/d,观察小鼠外周血和脏器内的*eGFP*⁺细胞变化等。

1.7 制备荧光细胞病理切片

1.7.1 改良小鼠整体灌注固定法^[9] 麻醉小鼠后,将导管插入主动脉并固定,剪开左或右心耳,依次以37℃磷酸缓冲液(PBS,pH = 7.4,下同)、37℃和4℃含4%多聚甲醛的PBS灌注固定小鼠,切取肝、脾、胸腺、脑、肺等组织标本(2~3 mm见方),再以含4%多聚甲醛的PBS后固定12 h,4℃避光保存,1周内以冰冻切片(Leica公司)制备OCT包被的5 μm厚度连续冰冻切片,切片可直接观察荧光或用于普通病理染色等^[10]。计数10个独立的荧光显微镜400倍视野,平均每个视野绿荧光细胞数(*n*) < 1计为“±”;1 ≤ *n* < 5计为“+”;5 ≤ *n* < 10计为“++”;如*n* ≥ 10,但*eGFP*⁺ < 全部细胞的90%计为“+++”,如*eGFP*⁺ ≥ 全部细胞的90%则计为“++++”^[7]。

1.7.2 液氮速冻法 脱臼处死小鼠后,快速将肝、脾、胸腺、脑和肺等新鲜组织切成小块,放入预先标记的冻存管中,投入液氮速冻30 s后即转入-80℃冰箱保存,尽快制备OCT包被的冰冻切片,-20℃保存,尽早观察。常规制备普通病理切片。

1.8 组织中荧光细胞的检测

1.8.1 外周血中荧光细胞的动态观察 尾静脉或眼球后静脉毛细管取血20 μl,或(处死小鼠前)摘除眼球

收集外周血,裂解红细胞后以流式细胞仪检测 *eGFP*⁺ 细胞的比例变化,同时可与血常规等结果比较。

1.8.2 其它组织中荧光细胞的观察 无菌收集腹水和外周血后脱臼处死小鼠,以 PBS 冲洗四肢空腔骨内的骨髓细胞,骨髓、外周血和(血性)腹水等含红细胞较多的标本流式细胞仪检测前需裂解红细胞^[10];肝、脾、胸腺等新鲜组织剪碎后,在 200 目不锈钢网上以注射器针芯研磨成单细胞悬液;脑组织剪碎后以 1% 胰酶 + 0.02% EDTA 于 37 °C 消化 30 min 获取单细胞悬液;细胞悬液以 PBS 洗涤 2 遍,70 μm 孔径尼龙网(Falcon 公司)过滤后,用相应组织的阴性细胞为对照,以流式细胞仪在 530 nm 的激发波长下检测各组织中的 *eGFP*⁺ 细胞,或滴于玻片上直接用荧光显微镜观察。

1.9 荧光细胞的分离培养^[11]

如 1.8.2 中无菌获得的细胞可用于体外常规培养和半固体培养。半固体培养时,细胞以 200 ~ 20 000 个/ml 的密度,分别接种于含 20% NBS、0.7% 甲基纤维素的 DMEM 半固体培养基中,14 d 后在荧光倒置显微镜下计数荧光集落。

1.10 PCR 检测 *eGFP* 基因

按试剂盒说明书抽提各组织的基因组 DNA 并进行 PCR 反应。*eGFP* 的引物序列^[5],上游引物:5'-GGC AAG CTG ACC CTG AAG TTC ATC-3';下游引物:5'-AAC TCC AGC AGG ACC ATG TGA TCG-3'。扩增条件为 94 °C、5 min + (94 °C、40 s,65 °C、50 s,72 °C、70 s) × 35 个循环 + 72 °C、10 min。PCR 产物以 1.2% 琼脂糖常规电泳后观察。

1.11 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 SPSS 6.0 统计软件进行 *t* 检

验和方差分析。

2 结果

2.1 基因导入对细胞的影响

P388-YCD-*eGFP*、P388-*eGFP* 细胞与野生型 P388 细胞在形态、生长曲线和体内致瘤性等方面差异不显著。腹腔接种后,3 组小鼠中位存活时间分别为(8.0 ± 1.0)d,(7.6 ± 0.9)d 和 (7.8 ± 1.7)d (*P* > 0.05, *n* = 5)。

2.2 转基因细胞的长期荧光表达

经流式细胞仪检测,P388-*eGFP* 细胞 *eGFP*⁺ 率为 80.2%,挑选的单克隆细胞 *eGFP*⁺ 率为 99.2%。体外传代 3 个月后 *eGFP*⁺ 率仍有 95.2%。序贯经腹腔内接种 3 次,终末期小鼠的腹水细胞 *eGFP*⁺ 率分别为(96.1 ± 2.44)%、(95.1 ± 1.67)% 和 (93.3 ± 0.50)% (*n* = 3),末次取样时间距首次接种细胞时间为(56.3 ± 1.25)d。P388-YCD-*eGFP* 经挑选的单克隆 *eGFP*⁺ 率为 99.6%。

2.3 转基因细胞在各组织中的分布

冰冻切片可敏感地检测出少至单个荧光阳性细胞。接种 P388 对照组小鼠的各种组织中未见荧光细胞。经 5-FC 治疗第 8 天时,YCD 组小鼠组织内的荧光细胞明显少于 *eGFP* 组,见表 1。光镜观察各脏器 H-E 染色切片,可见多少不一的异型肿瘤细胞,同荧光阳性细胞分布一致。流式细胞仪在各组织细胞悬液中可发现不同比例的荧光细胞,值得注意的是,不同组织的荧光本底不同,肝脏细胞阴性对照细胞平均荧光强度可达 62.54,而骨髓、脾、胸腺荧光阴性细胞平均荧光强度分别为 11.17、18.58 和 7.07。

表 1 5-FC 治疗第 8 天时各组小鼠组织中的 *eGFP*⁺ 细胞 (*n* = 3)

Tab. 1 *eGFP*⁺ cells in different organs after 8 days 5-FC treatment (*n* = 3)

Groups	Bone marrow ^①	Liver	Spleen	Thymus	Blood	Brain	Lung	Kidney	Intestinal tract	Heart	Ascitic fluid ^①
<i>eGFP</i> (FACS)	26.0 ± 14.21	18.8 ± 8.63	14.5 ± 11.65	25.8 ± 10.18	11.6 ± 6.68	<0.5% ^②	96.1 ± 2.44
YCD(FACS)	8.9 ± 6.69	1.9 ± 1.36	3.8 ± 5.6	11.4 ± 5.3	6.26 ± 5.88	<0.5% ^②
<i>eGFP</i> (FC) ^③	+++	+++	++	+++	++	±	+	+	++	±	+++
YCD(FC) ^③	++	+	+	++	±	-	±	-	±	±	...

① Cell smears were used for bone marrow and ascitic fluid, while frozen section were used in other tissues; ② *eGFP*⁺ cells can be found in cell suspension of brain by fluorescence microscope, but *eGFP*⁺ < 0.5%; ③ FC: Frozen section.

2.4 培养组织细胞的荧光集落形成情况

各组织细胞悬液在荧光显微镜下可见比例不等的荧光细胞,在培养液中可长期培养;骨髓细胞半固体培养基中培养 14 d 后形成的集落见图 1。培养 14 d 后,腹水、肝、脾和骨髓荧光集落形成率分别为(86.3 ±

6.7)%、(24.3 ± 8.4)%、(11.7 ± 2.5)% 和 (22.0 ± 2.6)% (*n* = 3)。

2.5 PCR 检测各组织中的 *eGFP* 基因

PCR 扩增产物 1.2% 琼脂糖电泳结果见图 2,目的基因片段长度为 550 bp。

2.6 5-FC 治疗后小鼠外周血 *eGFP*⁺ 细胞的变化

结果见图 3。第 8 天开始将 5-FC 加量治疗, 24 h 后, P388-YCD 组小鼠外周血 *eGFP*⁺ 细胞由 (17.4 ± 12.98)% 下降至 (6.3 ± 5.88)% , 并维持在较低水平。而 P388-*eGFP* 组仍持续上升, 由第 8 天的 (11.8 ± 8.37)% 上升至第 9 天的 (23.4 ± 9.62)% , 两组的 *eGFP*⁺ 细胞数有显著差异 ($P < 0.01$)。两组小鼠生存时间分别为 (13.0 ± 2.0)d 和 (8.2 ± 0.5)d ($n = 5$)。

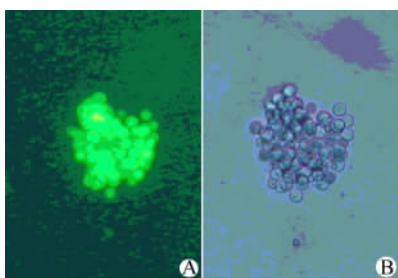


图 1 骨髓细胞半固体培养 14 d 的荧光集落 (×200)

Fig. 1 Cell clone from bone marrow cultured in semi-solid culture medium (×200)

A: By fluorescence microscope; B: By light microscope

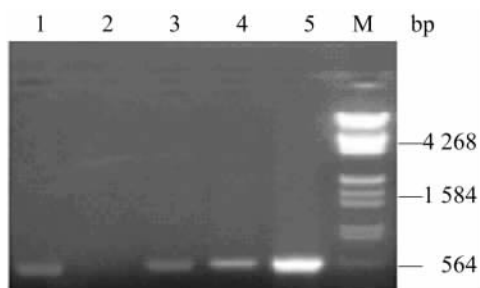


图 2 不同组织中 *GFP* 基因 PCR 产物的电泳图

Fig. 2 Determination *GFP* gene (550 bp) in organs by electrophoresis of PCR product

1: Liver; 2: Negative control; 3: Spleen; 4: Bone marrow; 5: Ascitic fluid; M: λ DNA/*EcoR* I + *Hind* III marker

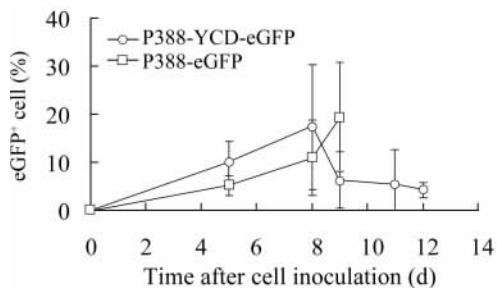


图 3 5-FC 治疗后小鼠外周血 *eGFP*⁺ 细胞的变化

Fig. 3 Changes of *eGFP*⁺ cells in peripheral blood of mouse after 5-FC treatment

3 讨论

移植细胞的观察既往常采用形态学、性染色体、荧光原位杂交等, 但形态学方法主观性强, 染色体和荧光原位杂交操作繁琐, 敏感性和特异性均不理想。基因标记技术通过将外源标记基因导入细胞, 使细胞获得特异而敏感的识别标志, 其中逆转录病毒载体法对细胞生物学特性几乎无损害, 导入基因可以长期表达, 故最为常用。经典的标记基因包括新霉素耐药基因 (*NeoR*) 和 β -半乳糖苷酶基因 (*Lac-Z*) 等^[12], 但鉴定 *NeoR* 需在一定浓度的药物 G418 作用下进行耗时 2 周的筛选或克隆形成实验, G418 价格昂贵, 且筛选本身可影响细胞特性; 鉴定 *Lac-Z* 基因需进行组化染色, 无法观察活细胞, 因部分组织中具有类似的天然酶, 导致本底较强, 不适用体内所有组织; 另外, 由于 *Lac-Z* 的表达具有一定毒性, 故某些较敏感的细胞无法用 *Lac-Z* 标记。

GFP 源自水母, 其蛋白产物在相应波长的紫外光激发下, 无需底物即可自发绿色荧光; 对细胞几无毒性。*GFP* 荧光标记细胞可用荧光显微镜、激光共聚焦显微镜和流式细胞仪等观察, 观察的标本包括冰冻切片、细胞悬液滴片、细胞涂片、组织印片和体外培养细胞等。本研究利用高效 RV 载体, 将 *eGFP* 基因整合入靶细胞基因组中, 靶细胞长期稳定地表达绿色荧光, 并可以传递给子代细胞, 便于长期观察, 而且每个细胞中一般只有单拷贝基因表达, 荧光表达相对均一, 流式检测时呈阳性单荧光峰。*GFP* 腺病毒载体^[13]和荧光素 (如 PKH-26)^[14]等也可用于标记细胞, 但由于不是稳定表达, 随着细胞分裂, 子代细胞荧光逐渐减低, 故无法长期观察。

本研究成功建立较系统的实验模型, 我们有如下体会: (1) 常规 H-E 染色、瑞氏-吉姆萨 (R-S) 染色和石蜡切片等操作可使荧光消失, 而多聚甲醛全身灌注固定法和新鲜组织液氮速冻法, 均可以较好地保存各种组织中细胞的荧光; (2) 整体灌注法需要一定技巧, 但更值得推荐。因液氮速冻法的标本在后续操作中, 常因温度变化和保管不善导致组织溶解和细胞结构的破坏; 而灌注固定制作的组织适用范围广, 切片可直接观察荧光或用于普通切片、组化染色、荧光原位杂交和电镜等, 还可利用连续切片以不同方法研究同一块组织, 方便地比较细胞的定位、种类和超微结构等; 本模型体系同样适用于 *RFP* 和 *YFP* 等其它荧光基因; (3) 流式细胞术可以快速、准确地检测大量 *GFP*⁺ 细胞, 并可以进行细胞分选, 但不同组织的荧光背景差异较大, 阴性对照必须选用相应的组织; (4) 滤网研磨法制备肝、脾、胸腺等的单细胞悬液效果较好, 但却会使脑组织产生大量细胞碎片 (碎片荧光本底信号较强), 故以酶消化法处理脑组织更合适; (5) 研究的关键之一是

以 *GFP* 高效标记细胞,具体方法可有多种选择。本研究制备的重组病毒标记效率较高,已成功标记多种肿瘤细胞和人原代 T 细胞等;如能采用慢病毒载体,则效率更高^[15]。如有必要,还可采用带有 *GFP* 和筛选基因的载体,通过药物筛选获得较纯的转基因细胞。当然,在感染效率足够高的情况下,则未必需要克隆筛选。如利用 *GFP* 转基因动物获得细胞,则更为简便^[16]。

本模型体系尚需进一步完善。比如,目前我们已经可以采用实时定量 PCR 技术(RQ-PCR),准确定量局部活检组织(包括软组织、软骨和骨组织)中不同荧光细胞的数量和比例变化。此外,新近出现的体内荧光成像系统^[17],可以在无创条件下,动态检测活体动物体内荧光细胞的增殖和迁移等,甚至是以 *RFP* 和 *GFP* 分别标记的多群细胞。

致谢:中国科学院神经生物所的张旭教授及鲍岚教授等,南京医科大学病理教研室冯振卿主任和李玉华老师等,对本研究工作均给予了大力帮助,谨致谢忱!

[参 考 文 献]

[1] Hanawa H, Hematti P, Keyvanfar K, *et al.* Efficient gene transfer into rhesus repopulating hematopoietic stem cells using a simian immunodeficiency virus - based lentiviral vector system[J]. *Blood*, 2004, 103(11): 4062-4069.

[2] 段小军, 杨 柳, 周 跃, 等. 不同荧光蛋白标记技术对兔骨髓基质干细胞体外增殖的影响[J]. *中华创伤骨科杂志*, 2004, 6(7): 731-734.

[3] 金传芳. 用磷酸钙法进行哺乳动物细胞的转染[M]//李永明, 赵玉琪. *实用分子生物学方法手册*. 北京: 科学出版社, 1998. 74-78.

[4] 江千里, 王健民, 温丽敏, 等. 批量快速测定法测定标志基因为 GFP 的重组病毒滴度[J]. *第二军医大学学报*, 2002, 23 (9): 1034-1035.

[5] Yang JM, Friedman MS, Bian H, *et al.* Highly efficient genetic transduction of primary human synovocytes with concentrated retroviral supernatant [J]. *Arthritis Res*, 2002, 4(3):215-219.

[6] 江千里, 达万明. 自制流动转染体系提高逆转录病毒介导的基

因导入效率的研究[J]. *解放军医学杂志*, 2001, 26(3):189-191.

[7] 江千里, 王健民, 温丽敏, 等. YCD 基因修饰对小鼠 P388 白血病的体内治疗作用研究[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志* 2003, 10 (2):84-87.

[8] 史剑慧, 许小平, 程文英, 等. 小鼠微小残留白血病模型的建立 [J]. *复旦学报:医学版*, 2002, 29(5): 383-386.

[9] Zhang X, Bao L, Xu ZQ, *et al.* Localization of neuropeptide Y Y1 receptors in the rat nervous system with special reference to somatic receptors on small dorsal root ganglion neurons[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(24): 11738-11742.

[10] 蔡文琴, 王伯云. *实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术* [M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1994. 204-230.

[11] 司徒镇强, 吴军正. *细胞培养* [M]. 西安: 世界图书出版社, 1996. 181-200.

[12] 奥斯帕 F, 布伦特 R, 金斯顿 RE, 等. *精编分子生物学实验指南* [M]. 颜子颖, 王海林, 译. 北京: 科学出版社, 1999. 319-323.

[13] Deng YB, Guo XT, Yuan QT, *et al.* Efficiency of adenoviral vector mediated CTLA4Ig gene delivery into mesenchymal stem cells [J]. *Chin Med J*, 2003, 116(11): 1649-1654.

[14] Collis, SJ, Neutzel, S, Thompson, TL, *et al.* Hematopoietic progenitor stem cell homing in mice lethally irradiated with ionizing radiation at differing dose rates[J]. *Radiat Res*, 2004, 162(1): 48-55.

[15] Hanawa H, Hematti P, Keyvanfar K, *et al.* Efficient gene transfer into rhesus repopulating hematopoietic stem cells using a simian immunodeficiency virus-based lentiviral vector system[J]. *Blood*, 2004, 103(11): 4062-4069.

[16] Galimi F, Summers RG, van Praag H, *et al.* A role for bone marrow-derived cells in the vasculature of noninjured CNS[J]. *Blood*, 2005, 105(6): 2400-2402.

[17] Bhaumik S, Gambhir SS. Optical imaging of renilla luciferase reporter gene expression in living mice[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(1): 377-382.

[收稿日期] 2006 - 05 - 10 [修回日期] 2006 - 07 - 06
[本文编辑] 韩 丹

· 读 者 · 作 者 · 编 者 ·

文稿中数字用法的要求

本刊严格执行国家标准《出版物上数字用法的规定》,文稿中凡是可以使用阿拉伯数字且很得体的地方,均应使用阿拉伯数字。(1)公历世纪、年代、年、月、日和时、分、秒必须使用阿拉伯数字,如 20 世纪 90 年代、2006 - 02 - 15、5 h、30 min、30 s、14:36:08 等;年份不能用简称,“1998 年”不能写作“98 年”。(2)物理量量值必须使用阿拉伯数字。(3)非物理量量词前面数字一般也应使用阿拉伯数字,如 3 支、5 根等。(4)数值范围的表达要求:5 万至 10 万应写成 5 万 ~ 10 万,不能写成 5 ~ 10 万; 3×10^9 至 5×10^9 应写成 $3 \times 10^9 \sim 5 \times 10^9$, 或 $(3 \sim 5) \times 10^9$, 不能写成 $3 \sim 5 \times 10^9$; 60% 至 70% 不能写成 60 ~ 70%, 应写成 60% ~ 70%; $25.5 \pm 0.5 \text{ mg}$ 应写成 $(25.5 \pm 0.5) \text{ mg}$ 。(5)带单位的量值相乘时,每个数值后单位不能省略,如 $4 \text{ mm} \times 2 \text{ mm} \times 3 \text{ mm}$, 不能写成 $4 \times 2 \times 3 \text{ mm}$ 或 $4 \times 2 \times 3 \text{ mm}^3$ 。

(本刊编辑部)