

甘丙肽重构基因 GAL(intronII) 的克隆 及其过表达转基因载体的构建

雷小春, 刘田福, 司苏晋, 薛亮亮, 张引红

(山西医科大学实验动物中心, 太原 030001)

【摘要】 目的 克隆甘丙肽重构基因 GAL(intronII), 构建小鼠神经系统特异性表达甘丙肽(galanin, GAL)的转基因载体 pUC18/PDGF- β -promoter/GAL(intronII), 为制备 GAL 转基因小鼠做准备。方法 通过常规 PCR、RT-PCR 及重叠延伸 PCR(overlap extension PCR, OE-PCR) 扩增出插入 GAL 第二内含子的 GAL 全长 cDNA 的重构基因 GAL(intronII), 将 GAL(intronII) 克隆入 T 载体进行酶切、测序鉴定; 同时从 psisCAT6 α 中切下血小板源性生长因子 β 链(platelet-derived growth factor beta polypeptide, PDGF- β) 启动子片段连接到空载体 pUC18 上构建出重组载体 pUC18/PDGF- β -promoter; 然后将 GAL(intronII) 定向克隆于 pUC18/PDGF- β -promoter 下游, 构建转基因载体 pUC18/PDGF- β -promoter/GAL(intronII)。结果 PCR 和限制性内切酶分析鉴定, 表明获得转基因载体 pUC18/PDGF- β -promoter/GAL(intronII)。通过对重构基因 GAL(intronII) 的 GALcDNA 和第二内含子序列测序证实其与 GenBank 中的标准序列一致, GAL(intronII) 中第二内含子插入的位置准确, 且无移码。结论 使用重叠延伸 PCR 扩增重构基因 GAL(intronII) 并成功构建转基因载体 pUC18/PDGF- β -promoter/GAL(intronII), 为转基因小鼠制备奠定一定的实验基础。

【关键词】 甘丙肽; 重叠延伸 PCR; 血小板源性生长因子启动子; 转基因载体

【中图分类号】 R363 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)01-0048-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2011.01.011

Clone of the Recombinant Molecule GAL (intronII) and Construction of Galanin Over Expressing Transgenic Vectors

LEI Xiao-chun, LIU Tian-fu, SI Su-jin, XUE Liang-liang, ZHANG Yin-hong

(Laboratory Animal Center of Shanxi Medical University, Taiyuan, 030001, China)

【Abstract】 Objective To clone the recombinant molecule GAL (intronII) and to construct the vector of transgenic mice model. **Methods** Firstly, the recombinant molecule GAL (intronII) was amplified by RT-PCR, PCR and overlap extension PCR (OE-PCR), then the GAL (intronII) which the second intron of GAL was inserted into the GAL full-length cDNA was cloned into pMD19-T simple vector. Secondly, the platelet-derived growth factor beta polypeptide (PDGF- β) promoter from the psisCAT6 α and the recombinant molecule GAL(intronII) was inserted into pUC18 vector in the correct order to form a recombinant vector pUC18/PDGF- β -promoter/GAL (intronII). **Results** The recombinant vector pUC18/PDGF- β -promoter/GAL(intronII) was obtained, positive clones were screened and identified by PCR and digestion with restriction enzyme. The sequence of GALcDNA and intronII was in accordance with the expected one, the insertion position of the second intron in the GAL (intronII) was accurate, and there was no base malposition. **Conclusion** The

[基金项目] 山西省实验动物专项基金资助项目:2008k(02)。

[作者简介] 雷小春, 女, 硕士生, 研究方向: 人类疾病动物模型。E-mail: sandra1116@126.com。

[通讯作者] 刘田福, 男, 教授, 研究方向: 人类疾病动物模型。E-mail: ykdltf@yahoo.com.cn。

recombinant molecule GAL (intronII) is obtained and the transgenic expression vector of GAL recombinant is successfully constructed, which may provide a basis for further researches.

【Key words】 Galanin; Overlap extension PCR; PDGF- β -promoter; Transgenic vector

甘丙肽 (galanin, GAL) 是 Tatemoto 等于 1983 年从猪小肠提取出的由 29 个氨基酸 (人类的 GAL 由 30 个氨基酸组成) 组成的羧基末端酰胺化的肽类物质, GAL 广泛分布在外周和中枢神经系统, 在下丘脑、海马、杏仁核、中缝背核、前脑基底皮层、室下带、嗅球以及脊髓背根神经节等区域都可检测到 GAL 及其受体的表达^[1]。在正常生理过程 GAL 表达水平比较低而稳定, 但是在一些病理过程中 GAL 表达会有异常的变化^[2]。近年研究还发现 GAL 与阿尔茨海默病、癫痫、高泌乳血症、抑郁、神经痛等的发病机制相关, 同时也与摄食、学习和记忆等功能相关^[3-6]。当前对于 GAL 转基因模型的研究热点主要集中于 GAL 缺失表达或者过表达模型中某些疾病相关的生理、病理特征, 定位 GAL 在这些生理、病理过程中的作用, 而在这些研究数据的取得大多数是建立在 GAL 转基因模型的基础上的^[7-9]。

为了研究人 PDGF- β 启动子调控下 GAL 的表达, 构建 GAL 过表达的转基因小鼠模型, 对 GAL 各项功能进行研究, 我们构建了能够在小鼠体神经系统中广泛过量表达的 GAL 转基因载体, 为下一步进行显微注射做好准备。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物: C57BL/6 小鼠由山西医科大学实验动物中心提供 [SCXK (晋) 2009-0001]。

1.1.2 菌株和质粒: 含人血小板源性生长因子启动子片段的 p_{sis}CAT6 α 质粒由中国协和医科大学实验动物中心秦川教授惠赠。大肠杆菌 DH5 α , 质粒 pMD-19simple, pUC18 均购自宝生物工程 (大连) 有限公司。

1.1.3 试剂: RNAiso Reagent, DNA Fragment Purification Kit, DNA A-Tailing Kit, DNA Wide Range DNA Marker (100-6000) 购自宝生物工程 (大连) 有限公司; Phusion 超保真聚合酶, SalI, PstI, XbaI, HindIII 限制性内切酶购自 NEB 公司; AMV 反转录酶、RNA 酶抑制剂购自 Promega 公司; QIAquick Gel Extraction kit 购自 Qiagen 公司, Plasmid Mini Kit 购自 Omega 公司; X-Gal、IPTG、Amp 购自 Amresco 公司。

1.1.4 主要引物: RT-PCR、常规 PCR 引物均参照 GenBank 中 GAL 基因和 cDNA 的标准序列, 使用 PrimerPremier5.0, Oligo6.72 软件进行设计。重叠延伸 PCR 引物根据理论上得出的重叠产物重新设计: 正向引物 F5' AAGGCGCCGGCGATATCCGGCCTGGT CGACTGCCACGGACACGTAGAG 3', 下划线序列为 SalI 限制性酶切位点; 反向引物 R5' AACGTTTACGAACCTGCAGCGATACGCTGCAGCATAGACG 3', 下划线序列为 PstI 限制性酶切位点。由北京奥科生物技术有限责任公司合成。

1.2 实验方法

1.2.1 C57BL/6 小鼠总 RNA、基因组 DNA 的提取: 处死小鼠, 取新鲜脑组织, 用 RNAiso 试剂和 DNA 提取试剂盒分别提取 C57BL/6 小鼠总 RNA 和基因组 DNA, 用紫外可见分光光度计检测 RNA 的浓度为 1.47 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 纯度为 1.98; DNA 的浓度为 0.33 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 纯度为 1.78。

1.2.2 扩增 GAL 全长 cDNA: RT-PCR 扩增 GAL cDNA 的编码部分的片段, 常规 PCR 扩增 GAL cDNA 5' 和 3' 部分非编码序列片段及 GAL 第二内含子, 以 GAL cDNA 的编码部分和 5'、3' 部分非编码序列片段通过重叠延伸 PCR 的方法获得 GAL 的 cDNA 全长片段 (包括编码部分、5' 端和 3' 端部分非编码片段), 分别用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定并测序。

1.2.3 在 GAL 全长 cDNA 中插入第二内含子构建重构分子 GAL (intronII): 常规 PCR: GAL 第二内含子需要插入的位点在 GAL 全长 cDNA 第三外显子的第 15 个碱基处, 以插入位点两侧的 25 个碱基加上第二内含子两端的 25 个碱基共 50 个碱基分别作为引物, 与扩增 GAL 全长 cDNA 的引物分别配对, 组成两组引物将插入位点两端的片段扩增出来, 即将 GAL 全长 cDNA 切成了两部分。1.2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定、测序。

重叠 PCR: 将上述步骤获得的 GAL 全长 cDNA 的两部分以及 GAL 第二内含子 PCR 产物等摩尔比混合作为重叠 PCR 的模板, 延伸 5 个循环, 加入引物。扩增条件: 98 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 1 min, 98 $^{\circ}\text{C}$ 、5 s, 68 $^{\circ}\text{C}$ 、15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 、50 s, 共 25 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 扩增出重构基因 GAL (intronII)。1.2% 琼脂糖凝胶电

泳鉴定、测序。

1.2.4 重组质粒 pMD19-T Simple/GAL(intronII) 的构建:胶回收 GAL(intronII) 片段 PCR 产物,进行加 A 反应,与 pMD19-T Simple 载体片段以摩尔比为 3:1 的比例混合,加入等体积 solution I,16℃ 进行连接反应 16 h。以 pMD19-T Simple 载体自我连接作为阴性对照。连接产物转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,同时转化阳性对照 pUC18 质粒和阴性对照 pMD19-T Simple 载体自我连接反应液。取 150 μL 转化菌涂于含氨苄青霉素(100 mg/L)、IPTG(20 mg/mL)和 X-Gal(20 mg/mL)的 LB 平板上,37℃ 孵育 16 h,随机挑 10 个白色单菌落扩大培养提取质粒,经 SalI、PstI 分步酶切筛选阳性克隆。将含插入 GAL(intronII)片段的质粒测序。

1.2.5 重组载体 pUC18/PDGF-β-promoter 的构建:将 psisCAT6α 转化到大肠杆菌中 DH5α 感受态细胞 37℃ 平板培养 16 h。随机挑取菌落接种在加有氨苄青霉素(100 mg/mL)的 5 mL LB 液体培养基中,37℃ 225 r/min 振荡培养过夜。收集菌体提取质粒,电泳进行初步鉴定。鉴定后取适量 psisCAT6α 质粒溶液和 pUC18 质粒溶液用限制性核酸内切酶 SalI、XbaI 于 37℃ 酶切 3 h。胶回收纯化 PDGF-β 启动子片段和线性 pUC18,用 Quantity One 分析软件进行定量。将 PDGF-β 启动子片段和线性 pUC18 按 3:1 的比例 16℃ 进行连接反应 16 h。以线性 pUC18 的自我连接作为阴性对照。连接产物转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,同时转化阳性对照 pUC18 质粒和阴性对照线性 pUC18 自我连接反应液。取 150 μL 转化菌涂于含氨苄青霉素(100 mg/L)、IPTG(20 mg/mL)和 X-Gal(20 mg/mL)的 LB 平板上,37℃ 孵育 16 h。随机挑 10 个白色单菌落扩大培养提取质粒,经 XbaI 和 SalI 双酶切筛选阳性克隆。将含 PDGF 启动子插入片段的质粒测序。

1.2.6 重组载体 pUC18/PDGF-β-promoter /GAL(intronII) 的构建:取适量的 pUC18/PDGF-β-promoter 质粒和 pMD19-T Simple/GAL(intronII) 质粒用限制性核酸内切酶 SalI、PstI 于 37℃ 酶切 3 h,胶回收纯化 GAL(intronII) 片段和线型 pUC18/PDGF-β-promoter,用 Quantity One 分析软件进行定量。将 GAL(intronII) 片段与线型 pUC18/PDGF-β-promoter 按 3:1 的比例 16℃ 进行连接反应 16 h。以线型 pUC18/PDGF-β-promoter 的自我连接作为阴性对照。连接产物转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,同

时转化阳性对照 pUC18 质粒和阴性对照线性 pUC18/PDGF-β-promoter 自我连接反应液。取 150 μL 转化菌涂于含氨苄青霉素(100 mg/L)、IPTG(20 mg/mL)和 X-Gal(20 mg/mL)的 LB 平板上,37℃ 孵育 16 h。随机挑取白色菌落扩大培养提取质粒,经 XbaI 和 HindIII 双酶切筛选阳性克隆。将含转基因片段 PDGF-β-promoter /GAL(intronII)的质粒测序。

所有测序中美泰和生物技术(北京)有限公司完成,使用 Clustalw 软件对测序结果进行分析。

2 结果

2.1 GAL 全长 cDNA 构建结果鉴定

由 RT-PCR、常规 PCR、重叠延伸 PCR 扩增得到了 GAL 的全长 cDNA 片段,序列长度为 810 bp,包括完整的 cDNA 序列 699 bp 和两端的酶切位点(分别为 55 bp 和 56 bp)。电泳鉴定 PCR 产物与所需扩增的目的片段长度相符(图 1),测序结果与 GenBank 中标准序列比对,相似性达 99%。

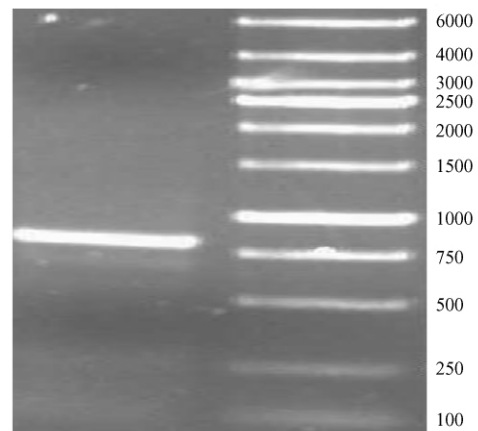


图 1 GAL 全长 cDNA 的 PCR 结果

Fig. 1 Electrophoresis of GAL full-length cDNA PCR products

2.2 重构分子 GAL(intronII) 构建结果的鉴定

重构分子是 GAL 全长 cDNA 分成的两部分以及第二内含子为模板重叠延伸出来的,长度为 1436 bp(图 2)。测序结果表明重叠延伸得到片段由 GAL 全长 cDNA 和第二内含子组成,第二内含子插入的位置准确,无突变和移码。

2.3 重组质粒 pMD19-T Simple/GAL(intronII) 的鉴定

pMD19-T Simple/GAL(intronII) 用 SalI、PstI 分步酶切,在电泳图中泳道 1 为酶切产物 2.7 kb 和 1.4 kb 的条带,其中 2.7 kb 的条带即为 pMD19-T

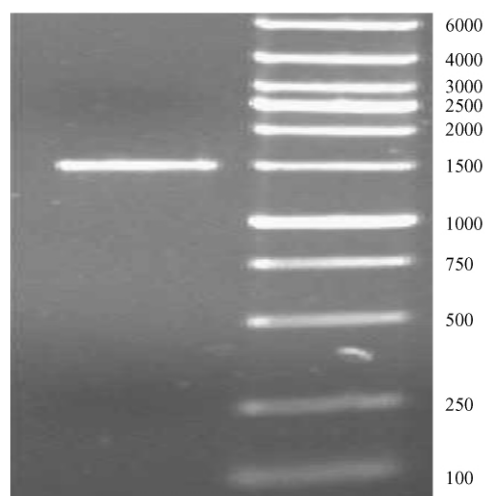


图 2 重构分子 GAL(intronII)的 PCR 结果

Fig. 2 Electrophoresis of GAL (intronII)

PCR products

Simple 载体长度为 2692 bp, 1.4 kb 的条带为 GAL (intronII) 长度 1436 bp。泳道 2 为没有酶切的 pMD19-T Simple / GAL(intronII) (图 3)。测序证明酶切得到的条带即为 pMD19-T Simple 载体和重构分子 GAL(intronII)。

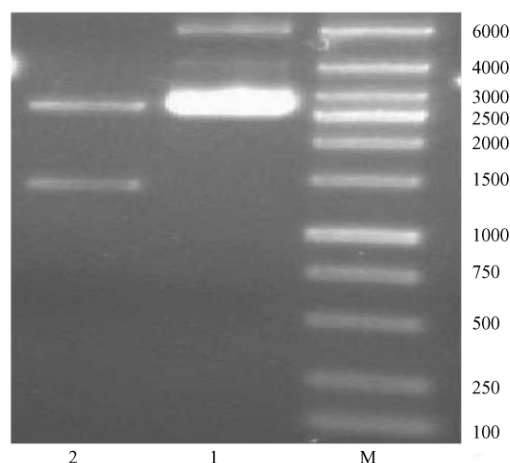


图 3 质粒 pMD19-T Simple / GAL (intronII)

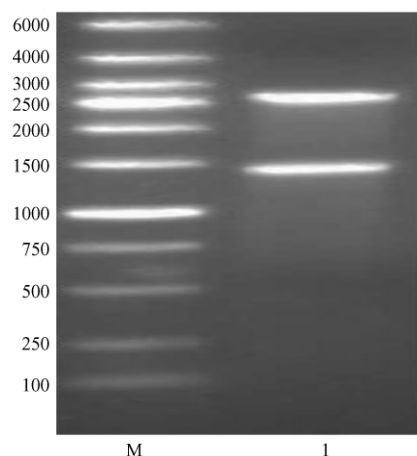
酶切鉴定

Fig. 3 Electrophoresis of enzyme digestion of plasmid pMD19-T Simple / GAL (intronII)

2.4 重组质粒 pUC18/PDGF- β -promoter 的鉴定

以 XbaI 和 SalI 双酶切重组质粒 pUC18/PDGF- β -promoter, 在电泳图中泳道 1 为酶切产物 2.7 kb 和 1.5 kb 的条带, 其中 2.7 kb 的条带为 PUC18 载体长度为 2686 bp, 1.5 kb 的条带为 PDGF- β 启动子片段长度为 1486 bp。测序结果证明酶切得到的条带即为 PDGF- β 启动子片段 (图 4)。测序结果与

Gene Bank 中标准序列比对, 相似性达 100%。

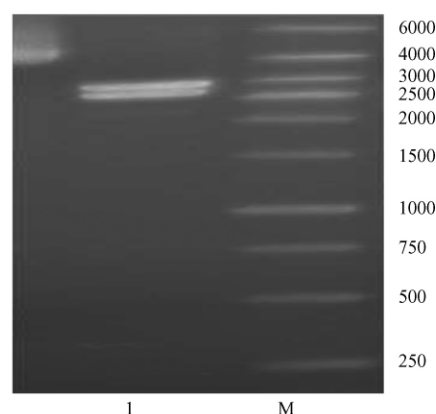
图 4 质粒 PUC18/PDGF- β -promoter

酶切鉴定

Fig. 4 Electrophoresis of enzyme digestion of the recombinant plasmid PUC18/PDGF- β -promoter

2.5 重组载体 pUC18/PDGF- β -promoter / GAL (intronII) 的鉴定

以 XbaI 和 HindIII 双酶切重组质粒 pUC18/PDGF- β -promoter / GAL (intronII), 在电泳图泳道 1 为酶切产物 2.7 kb 和 3.0 kb 的条带, 其中 2.7 kb 的条带为 PUC18 载体长度为 2686 bp, 3.0 kb 的条带为 1486 bp dePDGF- β 启动子和 1436 bp 的 GAL (intronII) 片段连接而得到的转基因片段 (图 5)。测序结果与理论上的重组片段进行比对, 相似性达到 99%。

图 5 质粒 PUC18/PDGF- β -promoter / GAL (intronII) 酶切鉴定Fig. 5 Electrophoresis of enzyme digestion of the recombinant plasmid PUC18/PDGF- β -promoter / GAL (intronII)

3 讨论

本实验参照了 Holmberg 和 Kuteeva 等的方法,在 GAL 全长 cDNA 插入第二内含子,但是插入的位点不同^[6]。根据 Barbara 等发表的研究,GAL cDNA 的第一外显子是非编码序列,第二外显子编码了 27 个碱基的前导序列,第三外显子的前 15 个碱基编码了信号序列。第三外显子的后 39 碱基和第四、五、六外显子编码了 GAL 和 GAL 相关肽(GMAP),第六外显子的后 150 个碱基为非编码序列^[10]。本研究中尝试运用重叠延伸 PCR 方法扩增的嵌入第二内含子的 GAL 全长 cDNA 的是一种嵌合分子,自然不存在,但是并没有打乱其基因表达框。早在上世纪 80 年代 Rochester 等在进行转基因植物和动物的研究中已经开始在 cDNA 中插入一段内含子以增强其表达。试验表明异源内含子(特别是第一、二内含子)可提高外源基因(特别是以 cDNA 为表达构件)的表达效率^[11,12]。Palmiter 等进行的转基因试验了发现含有内含子时能比 cDNA 的表达水平提高 5 ~ 75 倍^[13]。而国内学者卢一凡等的研究也得出类似的结论,并且证明了内含子插入的位置对转基因的表达没有影响^[14]。

本实验尝试了将 PCR 扩增技术应用于 DNA 片段连接。一般情况下采用限制性内切酶位点连接 DNA。本研究在扩增 GAL 全长 cDNA 和将第二外显子插入 cDNA 时采用了重叠延伸 PCR。这样既不需要考虑内切酶位点,连接效率高,同时也没有引入额外碱基,保持了正确的读码框,有利于基因表达。实验进行了两次重叠,第一次重叠是以 cDNA 的 3 个片段为模板的,所以扩增出的片段使重叠部分非常长,5' 和 3' 重叠的部分分别为 83 bp 和 109 bp,重叠延伸能有效进行;第二次重叠时内含子和切开的 cDNA 片段的引物中均为重叠部分故有两端都有 50 bp 的重叠部分,重叠也能有效进行。

大量的研究表明 GAL 在神经生理学过程包括对促性腺激素的神经内分泌的调节、生长激素的分泌、认知功能和癫痫易感性等过程起了重要作用。近几年来 GAL 转基因动物模型被不同领域的研究人员用于各种生理病理研究,如疼痛、癫痫、空间学习能力等^[15-17]。前期,人们对 GAL 模型的研究热点主要集中于阐明这些 GAL 缺失表达或者过表达模型中某些疾病相关的生理、病理特征^[18]。最近,研究者们开始探索 GAL 在生理病理过程中的作用

机制^[19]。GAL 的功能是通过 GAL 受体 GALR1, GALR2, GALR3 中的一个或多个介导的,基于研究的需要,研究人员对 GAL 受体进行基因修饰构建 GALR 基因敲除模型^[20-22]。随着 GAL 研究的深入,Lang R 提出了 GAL 家族,包括 GAL、GMAP、GAL 样肽、alarin 和 GAL 受体家族^[23]。

本研究构建的转基因载体采用一个在神经生理学模型研究应用较为成熟和广泛的血小板源性生长因子 β 链启动子来控制 GAL 在神经系统中过量表达,为构建一个有效的 GAL 过表达转基因,模型进行 GAL 的研究奠定了重要的基础。

参考文献:

- [1] Rao MS, Sun Y, Escary JL, et al. Leukemia inhibitory factor mediates an injury response but not a target-directed developmental transmitter switch in sympathetic neurons [J]. *Neuron*, 1993, 11:1175-1185.
- [2] Klimaschewski L, Tran TD, Nobiling R, et al. Plasticity of postganglionic sympathetic neurons in the rat superior cervical ganglion after axotomy [J]. *Microsc Res Tech*, 1994, 29:120-130.
- [3] Kerr BJ, Cafferty WB, Gupta YK, et al. Galanin knockout mice reveal nociceptive deficits following peripheral nerve injury [J]. *Eur J Neurosci*, 2000, 12:793-802.
- [4] Bo Åhrén, Pacini G, Wynick D, et al. Loss-of-function mutation of the Galanin gene is associated with perturbed islet function in mice [J]. *Endocrinology*, 2002, 145:3190-3196.
- [5] Hohmann JG, Teklemichael DN, Weinshenker D, et al. Obesity and endocrine dysfunction in mice with deletions of both neuropeptide Y and Galanin [J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24:2978-2985.
- [6] Holmberg K, Kuteeva E, Brumovsky P, et al. generation and phenotypic characterization of a galanin over expressing mouse [J]. *Neuroscience*, 2005, 133:59-77.
- [7] Mufson EJ, Counts SE, Perez SE, et al. Galanin plasticity in the cholinergic basal forebrain in Alzheimer's disease and transgenic mice [J]. *Neuropeptides*, 2005, 39:233-237.
- [8] Zheng K, Kuteeva E, Xia S, et al. Age-related impairments of synaptic plasticity in the lateral perforant path input to the dentate gyrus of galanin over expressing mice [J]. *Neuropeptides*, 2005, 39:259-267.
- [9] Mazarati AM, Hohmann JG, Bacon A, et al. Modulation of Hippocampus Excitability and Seizures by galanin [J]. *J Neurosci*, 2000, 20:6276-6281.
- [10] Barbara K, Marjorie L, Liu B, et al. Molecular cloning and characterization of the mouse preprogalanin gene [J]. *Gene*, 1982, 71-75.
- [11] Rochester DE, Winer JA, Shah DM, et al. The structure and expression of maize genes encoding the major heat shock protein,

- hsp70 [J]. EMBO J ,1986 ,5:451 – 458.
- [12] Keith B ,Chua NH. Monocot and dicotpre-mRNAs are processed with different efficiencies in transgenic tobacco [J]. EMBO J , 1986 ,5:2419 – 2425.
- [13] Choo KH ,Raphael K , McAdam W ,et al. Expression of active human blood clotting factor IX in transgenic mice: use of a cDNA with complete mRNA sequence [J]. Nucleic Acids Res ,1987 , 15:871 – 884.
- [14] 卢一凡 ,邓继先 ,肖成祖 ,等. 内含子的位置不影响转基因的表达 [J]. 生物技术通报 ,1998 ,4:68 – 71.
- [15] Brumovsky P ,Wiesenfeld-Hallin Z ,Hokfelt T ,et al. Phenotyping of sensory and sympathetic ganglion neurons of a galanin-over expressing mouse—possible implications for pain processing [J]. J Chem Neuroanat 2006 ,31:243 – 262.
- [16] Schlifke I ,Kuteeva E ,Hokfelt T ,et al. Galanin expressed in the excitatory fibers attenuates synaptic strength and generalized seizures in the piriform cortex of mice [J]. Exp Neurol ,2006 , 200:398 – 406.
- [17] Pirondi S ,D'Intino G ,Gusciglio M ,et al. Changes in brain cholinergic markers and spatial learning in old galanin-over expressing mice [J]. Brain Res 2007 ,1138:10 – 20.
- [18] Jacoby AS ,Holmes F ,Hort YJ ,et al. Phenotypic analysis of Galr1 knockout mice reveals a role for GALR1 galanin receptor in modulating seizure activity but not nerve regeneration [J]. Lett Pept Sci 2002 ,8:139 – 146.
- [19] Jacoby AS ,Hort YJ ,Constantinescu G ,et al. Critical role for GALR1 galanin receptor in galanin regulation of neuroendocrine function and seizure activity [J]. Mol Brain Res ,2002 ,107:195 – 200.
- [20] Blakeman KH ,Hao JX ,Xu XJ ,et al. Hyperalgesia and increased neuropathic pain-like response in mice lacking galanin receptor 1 receptors [J]. Neuroscience 2003 ,117:221 – 227.
- [21] Weinshenker D ,Hohmann JG ,Steiner RA ,et al. Phenotypic analysis of mice deficient in the type 2 Galanin receptor (GALR2) [J]. Mol Cell Biol 2005 ,25:4804 – 4811.
- [22] Krasnow SM ,Hohmann JG ,Gragerov A ,et al. Analysis of the contribution of galanin receptors 1 and 2 to the central actions of galanin-like peptide [J]. Neuroendocrinology ,2004 ,79: 268 – 277.
- [23] Lang R ,Gundlach AL ,Kofler B ,et al. The galanin peptide family: receptor pharmacology , pleiotropic biological actions , and implications in health and disease [J]. Pharmacol Ther , 2007 ,115:177 – 207.

(修回日期)2010-06-03

(上接第 47 页)

- [8] 杨尚琪 ,夏穗生. T 淋巴细胞疫苗诱导大鼠移植心存活时间延长的机制探讨 [J]. 中华器官移植杂志 2000 ,21(5):303.
- [9] 谷强业 ,闫庆福 ,丁桂林 ,等. 慢性重型肝炎血清甲胎蛋白检测意义 [J]. 临床肝胆杂志 2007 ,23(2):131 – 132.
- [10] Yang SS ,Cheng KS ,Lai YC ,et al. Decreasing serum alpha-fetoprotein levels in predicting poor prognosis of acute hepatic failure in patients with chronic hepatitis B [J]. J Gastroenterol , 2002 ,37(8):626 – 632.
- [11] Okano J ,Shiota G ,Matsumoto K ,et al. Hepatocyte growth factor exerts oval cells through the PBK/AKT signaling pathway [J]. Biochem Biophys Res Commun ,2003 ,309:298 – 304.
- [12] Enomoto H ,Yoshida K ,Kishima Y ,et al. Participation of hepatoma-derived growth factor in the regulation of fetal hepatocyte proliferation [J]. J Gastroenterol , 2002 ,37: 158 – 161.
- [13] 王辉 ,张志翠 ,罗小菊 ,等. 人脐血干细胞移植建立人鼠嵌合体动物模型实验研究 [J]. 实用医院临床杂志 2008 ,5(4)40 – 44.
- [14] Rice A ,Wood J ,Milross C ,et al. Conditions that enable human hematopoietic stem cell engraftment in all NOD/SCID mice [J]. Transplantation ,2000 ,69(5):927 – 935.
- [15] Kubota H ,Storms R ,Reich L. Variant forms of alpha fetoprotein transcripts expressal in human hematopoietic progenitors. Implications for their developmetal potential towards endoderm [J]. Biol Chem ,2002 ,277(31):27629 – 27635.
- [16] Sei K ,Yujiko T ,Rroko C ,et al. Human umbilical cord blood as a source of transplantable hepatic progenitor cells [J]. Stem Cells ,2003 ,21(2):217 – 227.

(修回日期)2010-05-07