论著

文章编号:1000-5404(2014)23-2338-05

磁共振报告基因 FTH1 慢病毒载体构建及其在人神经母细胞瘤细胞中的表达

贺小娅[1,2],蔡金华[1],秦 勇[1],高雅丽[3] (400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院:放射科[1],儿童发育疾病研究省部共建教育部重点实验室,儿科学重庆市重点实验室,重庆市儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地[2];400013 重庆,重庆市妇幼保健院放射科[3])

[摘要] **目的** 构建携带人铁蛋白重链多肽1(fevritin heavy chaik 1,FTH1)基因的慢病毒载体,并检测其在人神经母细胞瘤细胞(SK-N-SH)中的表达。**方法** 以慢病毒为载体,将 FTH1 基因转入 SK-N-SH 细胞中。实验组(SK-N-SH-FTH1)、空载组(SK-N-SH-GFP)和空白组(SK-N-SH),均用含 500 μmol/L 枸橼酸铁铵(FAC)的培养基培养并连续 4 次传代。CCK-8 试剂检测细胞增殖活性;普鲁士蓝染色及透射电镜检测细胞聚铁效能;MR 成像(MRI)观察 T_2WI 信号变化;Western blot 检测 FTH1 表达情况。**结果** CCK-8 试剂检测发现 3 组细胞未添加 FAC 培养时,其增殖能力无显著差异[实验组(0.99±0.03),空载组(0.99±0.02),空白组(0.98±0.05);$P>0.05$];然而,添加 500 μmol/L FAC 后,其增殖能力[实验组(0.73±0.08),空载组(0.76±0.02),空白组(0.73±0.39)]均较前明显减低($P<0.05$)。普鲁士蓝染色及透射电镜显示实验组细胞内聚集较多的铁颗粒;MR 扫描显示在 500 μmol/L FAC 培养条件下,实验组 T_2WI 信号显著降低;Western blot 结果显示实验组 FTH1 表达,且经 4 次传代后仍持续稳定表达。**结论** 成功构建携带 FTH1 基因的慢病毒载体,并证明 FTH1 在 SK-N-SH 细胞中长期稳定表达及聚铁能力。

[关键词] FTH1;慢病毒载体;磁共振报告基因;人神经母细胞瘤细胞

[中图法分类号] R394-33; R445.2; R730.264 [文献标志码] A

Construction of recombinant lentivirus vector carrying FTH1 as an endogenous MRI reporter gene and its expression in SK-N-SH cells

He Xiaoya[1,2], Cai Jinhua[1], Qin Yong[1], Gao Yali[3] ([1]Department of Radiology, [2]Key Laboratory of Child Development and Disorders Cofounded by Chongqing and Ministry of Education, Chongqing Key Laboratory of Pediatrics, Chongqing International Science and Technology Cooperation Center for Child Development and Disorders, the Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400014; [3]Department of Radiology, Chongqing Health Center for Women and Children, Chongqing, 400013, China)

[**Abstract**] **Objective** To construct a lentiviral vector carrying human fevritin heavy chaik 1 (FTH1) gene and observe its expression in neuroblastoma SK-N-SH cells. **Methods** The FTH1 gene was transferred into SK-N-SH cells by using a lentiviral vector. The cells in experimental group (SK-N-SH-FTH1), mock group (SK-N-SH-GFP) and blank group (SK-N-SH) were cultured in the medium containing 500 μmol/L ferric ammonium citrate (FAC) for 4 passages, respectively. The effect of FTH1 over-expression or FAC on cell viability was tested by CCK-8 assay. Prussian blue staining and transmission electron microscopy were used to determine iron accumulation in the cells. MR imaging was performed to determine the changes of T_2WI signal intensity of cells *in vitro*. The expression of FTH1 gene was detected by Western blot analysis. **Results** CCK-8 assay showed there was no significant difference in cell viability among the 3 groups of cells cultured in the medium without FAC (SK-N-SH-FTH1: 0.99±0.03, SK-N-SH-GFP: 0.99±0.02, SK-N-SH: 0.98±0.05, $P>0.05$). However, when the culture medium contained 500 μmol/L FAC for 48 h, the cell viability was significantly reduced (SK-N-SH-FTH1:0.73±0.08; SK-N-SH-GFP: 0.76±0.02; SK-N-SH: 0.73±0.39, $P<0.05$). Prussian blue staining and transmission electron microscopy showed a great large amount of iron particles were accumulated in the experimental cells. Accordingly, T_2WI signal intensity was significantly decreased in the experimental cells than the other 2 types of control cells. Western blot analysis confirmed that

[基金项目] 国家自然科学基金(81171387);重庆市医学科研计划项目(2011-2-259);重庆市教委科学技术研究项目(KJ080313)

[通信作者] 蔡金华,电话:(023)63632016,E-mail: cjh710506@tom.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141106.1620.030.html (2014-11-06)

FTH1 was expressed continuously and stably in the experimental cells even at the 4th passage. **Conclusion** The recombinant lentivirus vector carrying FTH1 gene is constructed successfully, and its stable over-expression results in iron accumulation in SK-N-SH cells after infection.

[**Key words**] fevritin heavy chaik 1; lentivirus vector; MRI reporter; neuroblastoma cells

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81171387), the Project of Medical Research of Chongqing (2011-2-259) and the Project of Science and Technology Research of Chongqing Municipal Education Committee (KJ080313). Corresponding author: Cai Jinhua, Tel: 86-23-63632016, E-mail: cjh710506@tom.com

对移植细胞的示踪是 MRI 分子影像学重要任务之一[1-2],以往多采用超顺磁性氧化铁纳米颗粒(SPIOs)标记细胞,但该方法存在一个固有缺陷,即细胞内铁含量会随着细胞的分裂增殖而逐渐减少[3]。MRI 报告基因成像可利用基因在细胞内持续表达并聚铁实现对细胞的长期示踪,为上述问题提供了解决方案。在诸多 MRI 报告基因中,铁蛋白基因作为一种内源性报告基因近年来备受关注。铁蛋白为一种储铁蛋白,广泛存在于多种生物体内,其重链多肽亚基具有亚铁氧化酶活性,能在较低的铁负荷条件下表现出高的横向弛豫率,从而引起 MRI 信号的改变,是一种理想的 MRI 报告基因[4-7]。目前,有关铁蛋白基因成像的研究已经取得一定成果。然而,许多关键问题尚未解决,如基因表达的稳定性和安全性、基因检测的敏感性、基因表达的效能以及表达的调控等。本研究通过构建 FTH1 基因的慢病毒,并感染人神经母细胞瘤细胞(SK-N-SH),体外观察 FTH1 表达的稳定性及其聚铁能力,为进一步研究移植细胞的活体示踪奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人神经母细胞瘤细胞株由重庆医科大学附属儿童医院儿童发育疾病研究省部共建教育部重点实验室提供。

1.1.2 目的基因、慢病毒载体及慢病毒包装系统 基因委托威斯腾生物技术中心合成,含 GFP 报告基因的慢病毒载体质粒 pLenti-GTP 及慢病毒包装系统由威斯腾生物技术中心提供。

1.1.3 主要试剂及细胞 引物委托威斯腾生物技术中心合成,PCR 扩增试剂盒、限制性内切酶 *Eco*R Ⅰ和 *Not* Ⅰ为 TaKaRa 公司产品,T_4DNA 连接试剂盒(New England Biolabs),大肠杆菌菌株 DH5α(Invitrogen),质粒小量制备试剂盒(Axygen),DMEM、胎牛血清为 Hyclone 公司产品,枸橼酸铁铵(Sigma),普鲁士蓝染色试剂盒(广州凯秀贸易有限公司),CCK-8 试剂(Beyotime);细胞全蛋白提取试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司),一抗 rabbit anti-FTH1(Abcam),mouse anti-β-actin(南京钟鼎生物技术有限公司);二抗 Anti-rabbit(Abgent),Anti-mouse(Genscript)。

1.2 实验方法

1.2.1 重组慢病毒载体 pLenO-GTP-FTH1 的构建及鉴定 人工合成 FTH1 基因的 cDNA 序列,再行 PCR 扩增。PCR 产物和 pLenO-GTP 载体通过 *Eco*R Ⅰ、*Not* Ⅰ双酶切、PCR 扩增及琼脂糖电泳分离纯化后,将目的片段与酶切的空载体连接,获得重组慢病毒载体 pLenti-GTP-FTH1。连接产物转化大肠杆菌 DH5α感受态细胞后,转至氨苄霉素(AMP)抗性的 LB 琼脂培养基上培养,挑选重组的克隆菌株行 PCR 鉴定,再将鉴定正确的阳性克隆菌株抽提质粒后行双酶切鉴定,最后进行 DNA 测序和分析比对。

1.2.2 携带 FTH1 基因的重组慢病毒包装和病毒滴度的测定 将重组慢病毒质粒 pLenO-GTP-FTH1 及包装质粒和包膜质粒行高纯度无内毒素抽提后共转染 293T 细胞,获得携带 FTH1 基因的重组慢病毒,并采用逐孔稀释滴度测定法测定病毒滴度,同时构建空载慢病毒作为对照。

1.2.3 SK-N-SH 细胞的培养及感染 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养,培养条件为 37 ℃,5% CO_2。设计 3 个不同的处理组:实验组(SK-N-SH-FTH1),以携带 FTH1 基因的慢病毒感染处于对数生长期的 SK-N-SH 细胞,荧光显微镜观察细胞荧光情况,利用流式细胞仪筛选出高表达绿色荧光的细胞;空载组(SK-N-SH-GFP),用空载慢病毒感染细胞,相同方法观察并筛选细胞;空白组(SK-N-SH),仅用添加等量 PBS 的培养基培养细胞。3 组细胞连续 4 次传代培养。

1.2.4 FTH1 在 SK-N-SH 细胞中的表达检测

1.2.4.1 CCK-8 试剂检测细胞增殖活性 将处于对数生长期的 3 组细胞均匀铺于 96 孔板(8×10^3/孔,100 μL/孔)内,分为 FAC(+)组和 FAC(-)组,每组均设 5 个复孔。培养 48 h 后,每孔加入 10 μL CCK-8 试剂后轻轻摇匀,继续孵育 1.5 h 后,采用酶标仪(波长 450 nm 和 650 nm)测量各孔的光密度值。

1.2.4.2 普鲁士蓝染色 同等条件下 3 组细胞经含 500 μmol/L FAC 的培养基培养 48 h,PBS 充分漂洗,4% 多聚甲醛固定 15~20 min,加入普鲁士蓝染色试剂(2% 亚铁氰化钾和 2% HCl 等体积混合)室温孵育 30 min,最后,核固红染色 2~3 min,ddH_2O 冲洗,中性树胶封片。

1.2.4.3 透射电镜 3 组细胞在 500 μmol/L FAC 的条件下培养 48 h,PBS 清洗数次,消化、离心,每组细胞收集约 1×10^6 个。沿管壁缓缓加入电镜固定液,送往透射电镜室检测。

1.2.4.4 细胞 MR 成像 同等条件下分别用含 200 μmol/L FAC 和 500 μmol/L FAC 的培养基培养 3 组细胞 96 h,PBS 彻底清洗细胞以除去游离铁离子。消化、离心收集细胞(约 2×10^7 个),4% 多聚甲醛固定 10 min,再用 PBS 清洗数次后离心。行 3.0T MR(Philips)扫描,扫描参数:自旋回波(SE)T_2WI:TR=2 200 ms,TE=80 ms,成像视野(FOV)为 120 mm×120 mm,层厚 1 mm,层间距 0.1 mm。同时,各组设立 FAC(-)作为对照。

1.2.4.5 Western blot 检测 采用细胞全蛋白提取试剂盒获取 3 组细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,经 SDS-PAGE 电泳

后转至PVDF上,5% BSA封闭1 h,β-actin一抗(1∶1 000)和FTH1一抗(1∶1 000)孵育并4 ℃过夜,二抗孵育1~2 h,最后利用ECL发光试剂显影。

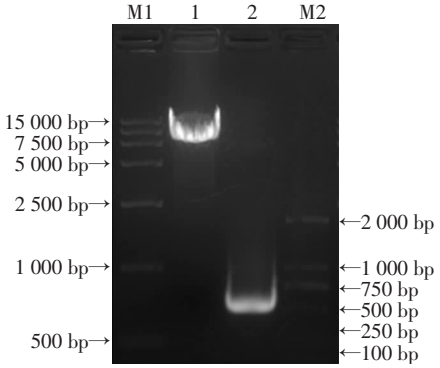
1.3 统计学方法

采用SPSS 17.0统计软件对获得的数据进行处理,结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,同种细胞不同处理组(实验组、空载组和空白组)采用单因素方差分析,两组数据之间采用独立样本 t 检验。

2 结果

2.1 pLenO-GTP载体和FTH1基因PCR产物酶切后的鉴定

将pLenO-GTP载体和FTH1基因的PCR产物经*Eco*RⅠ、*Not*Ⅰ双酶切、扩增及琼脂糖电泳分离检测后,分别获得与pLenO-GTP载体和FTH1基因碱基对理论长度一致的清晰条带。其中位于7 500~10 000 bp之间的条带为pLenO-GTP载体,位于500~750 bp之间的条带为FTH1基因的PCR产物(图1)。

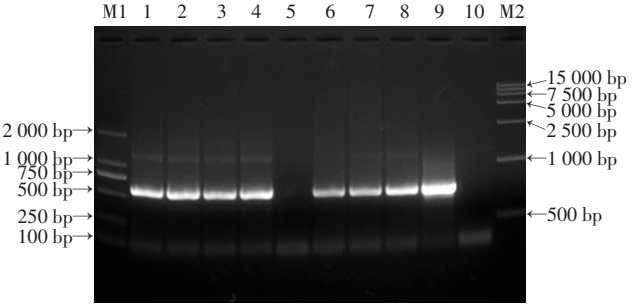


M1:DL 15 000标准;M2:DL 2 000标准;1:pLenO-GFP载体双酶切产物;2:FTH1基因PCR产物双酶切产物

图1 pLenO-GFP载体和FTH1基因双酶切鉴定结果

2.2 重组慢病毒载体质粒pLenO-GTP-FTH1的鉴定

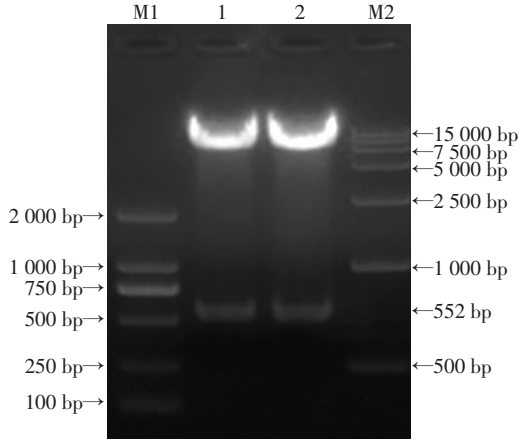
2.2.1 PCR鉴定 将重组慢病毒载体质粒pLenO-GTP-FTH1,电转化大肠杆菌DH5α感受态细胞,长出的克隆行PCR鉴定。结果显示在1~4号和6~8号样本中可以看见和9号阳性对照(FTH1原质粒,552 bp)一样清晰的条带,均处于DL 2000标准的500 ~750 bp和DL 15 000标准的500~1 000 bp(图2),表明转化后的重组质粒中含有FTH1基因。



M1:DL 2 000标准;M2:DL 15 000标准;1~4号和6~8号均为实验组(重组FTH1质粒);9:阳性对照(FTH1原质粒);5、10为阴性对照(H_2O)

图2 PCR鉴定FTH1重组细菌克隆结果

2.2.2 酶切鉴定及重组质粒测序 挑取PCR鉴定正确的克隆菌株序号①、②PCR产物经双酶切后,在两组样本中分别可以看见两条清晰的条带。位于7 500~10 000 bp之间的条带为pLenO-GTP的长度,位于500~750 bp之间的条带为FTH1基因的长度(图3)。将阳性克隆菌株①进行DNA测序和分析,结果表明:获得的目的基因片段与GenBank公布的FTH1基因碱基对序列一致。

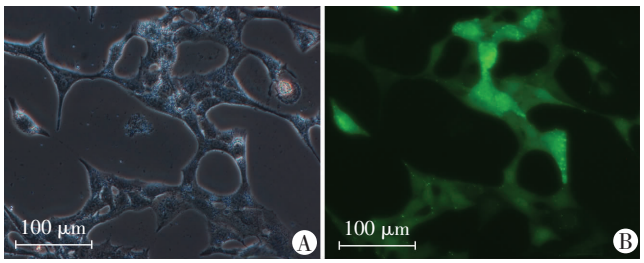


M1:DL 2 000标准;M2:DL 15 000标准;1:①号阳性克隆;2:②号阳性克隆

图3 重组阳性细菌克隆双酶切鉴定结果

2.3 慢病毒感染SK-N-SH细胞及检测FTH1基因在目的细胞中的表达

2.3.1 荧光显微镜观察细胞绿色荧光蛋白表达 将含有FTH1基因的重组慢病毒和空载慢病毒分别感染SK-N-SH细胞48 h后,荧光显微镜显示SK-N-SH细胞内可见明显的绿色荧光(图4),表明慢病毒成功感染SK-N-SH细胞。

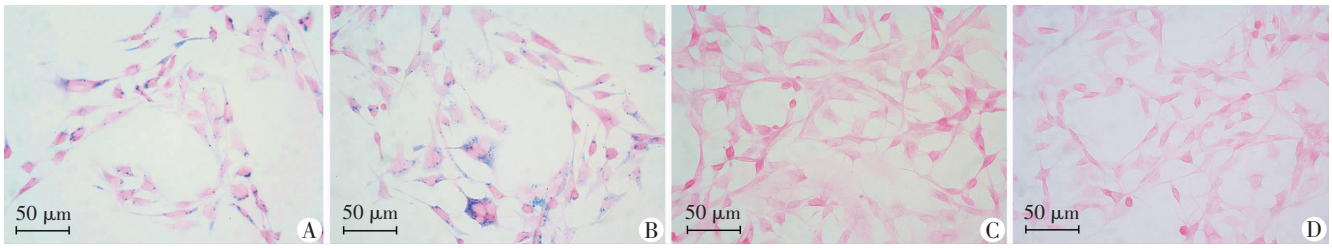


A:明场照片;B:荧光视野照片

图4 荧光显微镜观察慢病毒感染48 h后SK-N-SH细胞绿色荧光表达

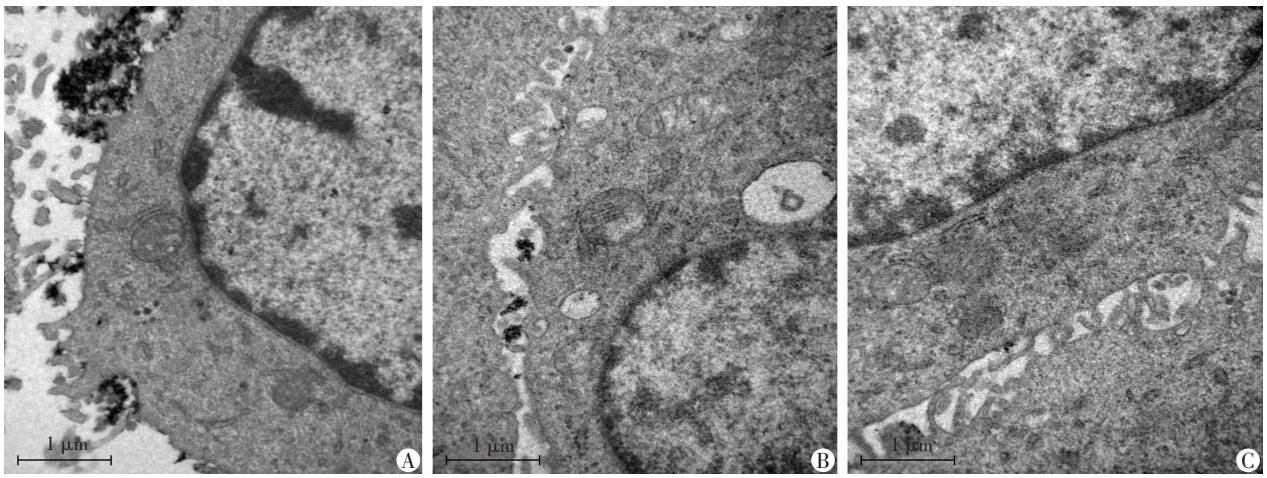
2.3.2 细胞增殖活性检测(CCK-8) 获得的光密度值经统计分析后发现,SK-N-SH细胞感染慢病毒前后其增殖活性无明显差异[实验组(0.99±0.03),空载组(0.99±0.02),空白组(0.98±0.05),$P>0.05$];然而,添加500 μmol/L FAC培养48 h后,3组细胞的增殖活性[实验组(0.73±0.08),空载组(0.76±0.02),空白组(0.73±0.39)]均较相应的FAC(-)组显著降低($P<0.05$)。

2.3.3 普鲁士蓝染色结果 结果显示实验组大部分细胞质中可见明显的蓝染颗粒,将细胞连续4次传代,添加相同浓度的FAC培养,再次染色后发现细胞内仍见大量的蓝染颗粒;而空载组和空白组未见明显的蓝染颗粒(图5)。



A:实验组;B:实验组(4 次传代后);C:空载组;D:空白组

图 5　普鲁士蓝染色观察 SK-N-SH 细胞摄铁量

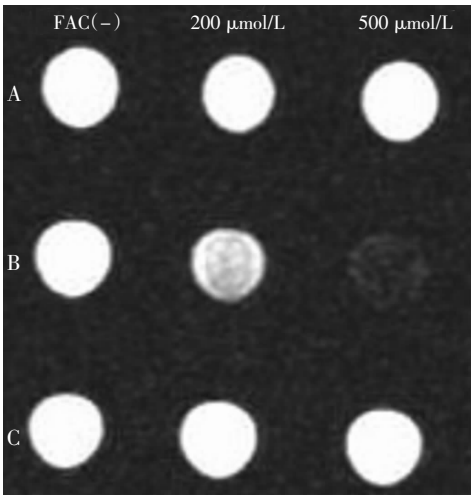


A:实验组;B:空载组;C:空白组

图 6　透射电镜观察 SK-N-SH 细胞结合铁情况

2.3.4　透射电镜　　3 组细胞经 500 μmol/L FAC 培养 48 h 后,收集细胞沉淀行透射电镜检测,结果显示实验组细胞的胞膜上聚集了大量黑色电子致密颗粒,胞质内还可见多处随吞饮泡进入并融合成大小不等的黑色颗粒团;而空载组和空白组仅在部分细胞间见到少许电子致密颗粒,但与细胞膜关系不密切,细胞质内也未见明显的黑色电子致密颗粒(图 6)。

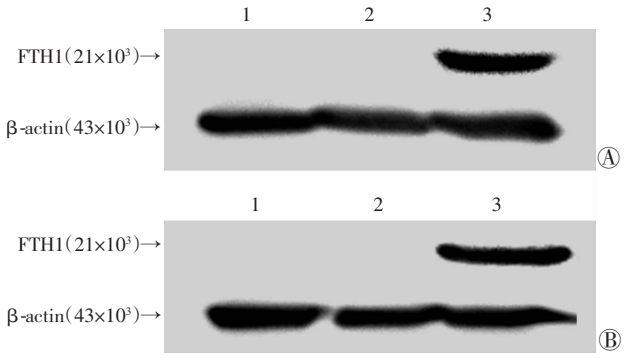
2.3.5　MR 成像　　采用 SE 序列对 3 组细胞行 T_2WI 扫描,结果显示,3 组细胞添加 200 μmol/L FAC 培养后,实验组信号较其余两组细胞有一定程度的降低,添加 500 μmol/L FAC 培养后,实验组信号显著降低;而空载组和空白组信号无明显改变(图 7)。



A:空白组; B:实验组;C:空载组

图 7　实验组、空载组、空白组细胞 MR 成像

2.3.6　细胞 FTH1 表达检测　　Western blot 结果显示,实验组中可以观察到 21×10^3 左右处有阳性条带,与 FTH1 理论大小吻合;而其余两组细胞中未检测到目的蛋白表达。传代 4 次后实验组 FTH1 仍稳定表达(图 8)。



1:空白组;2:空载组;3:实验组　A:亲代;B 为 A 经 4 次传代

图 8　Western blot 检测 SK-N-SH 细胞 FTH1 表达

3　讨论

在分子影像学研究领域,MRI 因较高的软组织分辨率及无辐射等优势成为最具潜力的成像手段[8]。目前,MRI 对移植细胞的显示主要通过直接成像和间接成像两种方式,前者主要应用 SPIOs 标记细胞,后者即报告基因成像。研究发现,利用 SPIOs 标记细胞后,MRI 仅可示踪 2 ~ 4 周;而且这些铁颗粒所引起的低信号改变也不能完全反映移植细胞在体内的真实分布及

存活状态,因为部分移植细胞死亡后,铁颗粒释放可被宿主细胞吞噬,有可能误导对 MRI 示踪结果的判断[3]。理论上,MRI 报告基因成像能够克服上述缺陷,实现对细胞的长期示踪[3,9]。铁蛋白为细胞内主要的储铁蛋白,有重链和轻链两种亚基,其中对铁储存起主要作用的是铁蛋白重链[5,10-11]。本研究以慢病毒为载体,将 FTH1 基因转入 SK-N-SH 细胞中。普鲁士蓝染色和透射电镜显示实验组细胞内聚集大量的铁颗粒,且经连续4次传代后铁颗粒未见明显减少。同时,MRI 发现在 500 μmol/L FAC 培养条件下,实验组 T_2WI 信号明显减低,而另外两组对照组信号无显著改变。另外,Western blot 结果证实实验组 FTH1 高表达,且经4次传代后表达无明显减弱。以上结果足以确证 FTH1 基因已成功整合到靶细胞基因组中并持续稳定表达,这一特性对移植细胞的长期示踪非常重要。

FTH1 作为磁共振报告基因的安全性一直是一个热议的话题。FTH1 对靶细胞的影响主要在两个方面:一是 FTH1 过表达本身对细胞的影响;二是 FTH1 过表达所聚集的铁离子对细胞的影响。目前,众多学者对此进行了探讨,Cozzi 等[12]发现,FTH1 在 HeLa 细胞中过表达可显著降低其生长活性,但移至含一定浓度铁剂的培养基中一段时间后,细胞增殖活性会恢复正常。Liu 等[13]研究显示,过表达 FTH1 的 C6 胶质瘤细胞增殖活性减低,而在小鼠胚胎干细胞中,无论培养基中有无铁剂,FTH1 的过表达都不会影响其增殖活性。但对骨骼肌母细胞而言,无论细胞是否表达 FTH1,高浓度 FAC 均会抑制其增殖,但高浓度 FAC 对不表达 FTH1 的细胞毒性显著高于表达 FTH1 的细胞;然而,在低浓度(1 μmol/L)FAC 培养环境中,细胞的生长均不受影响;这一结果提示,表达 FTH1 的细胞在高浓度铁剂条件下生长和生存更有优势[3]。以上研究结果差异较大,其原因可能是不同的细胞对转基因表达水平不一;同时不同的细胞对铁离子的敏感性和耐受性也不尽一致。本研究利用 CCK-8 试剂检测 SK-N-SH 细胞在感染慢病毒以及添加 FAC 培养后其增殖活性的变化,结果表明感染慢病毒后,细胞的增殖活性无明显改变,提示 FTH1 过表达对 SK-N-SH 细胞的增殖并无明显影响;然而,添加 500 μmol/L FAC 一段时间后,3 组细胞的增殖活性均显著降低。据此,我们推测除了细胞内过多的铁离子对细胞增殖造成影响外,培养基中的铁浓度可能也是影响其活性的因素之一。

需要强调的是,我们在体外研究 FTH1 的聚铁作用时,在培养基中添加了一定浓度的铁剂,而体内 FTH1 发挥聚铁效能主要依靠摄取周围组织中的铁离子,这能否满足 MRI 成像的需要,有待进一步体内试验证实。另外,利用基因表达调控系统对报告基因进行适当调控,最大限度地避免基因持续表达并聚铁对细胞的影响,也是今后的研究方向之一。

总之,本实验将 FTH1 基因成功转入 SK-N-SH 细胞中,实现了基因长期稳定表达,并初步证实了 FTH1 在细胞中的聚铁效能,为进一步研究移植细胞的活体示踪奠定了基础。

参考文献:

[1] Li K, Qin J, Wang X, *et al*. Magnetic resonance imaging monitoring dual-labeled stem cells for treatment of mouse nerve injury[J]. Cytotherapy, 2013, 15(10): 1275-1285.

[2] Vandsburger M H, Radoul M, Cohen B, *et al*. MRI reporter genes: applications for imaging of cell survival, proliferation, migration and differentiation[J]. NMR Biomed, 2013, 26(7): 872-884.

[3] Naumova A V, Reinecke H, Yarnykh V, *et al*. Ferritin overexpression for noninvasive magnetic resonance imaging-based tracking of stem cells transplanted into the heart[J]. Mol Imaging, 2010, 9(4): 201-210.

[4] Kim H S, Joo H J, Woo J S, *et al*. *In vivo* magnetic resonance imaging of transgenic mice expressing human ferritin[J]. Mol Imaging Biol, 2013, 15(1): 48-57.

[5] Hasegawa S, Furukawa T, Saga T. Molecular MR imaging of cancer gene therapy: ferritin transgene reporter takes the stage[J]. Magn Reson Med Sci, 2010, 9(2): 37-47.

[6] Kim H S, Cho H R, Choi S H, *et al*. *In vivo* imaging of tumor transduced with bimodal lentiviral vector encoding human ferritin and green fluorescent protein on a 1.5T clinical magnetic resonance scanner[J]. Cancer Res, 2010, 70(18): 7315-7324.

[7] Kim D, Chung N K, Allen S, *et al*. Ferritin-based new magnetic force microscopic probe detecting 10 nm sized magnetic nanoparticles[J]. ACS Nano, 2012, 6(1): 241-248.

[8] McLaughlin R, Hylton N. MRI in breast cancer therapy monitoring[J]. NMR Biomed, 2011, 24(6): 712-720.

[9] Lee S W, Lee S H, Biswal S. Magnetic resonance reporter gene imaging[J]. Theranostics, 2012, 2(4): 403-412.

[10] Ziv K, Meir G, Harmelin A, *et al*. Ferritin as a reporter gene for MRI: chronic liver over expression of H-ferritin during dietary iron supplementation and aging[J]. NMR Biomed, 2010, 23(5): 523-531.

[11] Oshtrakh M I, Alenkina I V, Vinogradov A V, *et al*. Mossbauer spectroscopy of the iron cores in human liver ferritin, ferritin in normal human spleen and ferritin in spleen from patient with primary myelofibrosis: preliminary results of comparative analysis[J]. Biometals, 2013, 26(2): 229-239.

[12] Cozzi A, Corsi B, Levi S, *et al*. Overexpression of wild type and mutated human ferritin H-chain in Hela cells: *in vivo* role of ferritin ferroxidase activity[J]. J Biol Chem, 2000, 275(33): 25122-25129.

[13] Liu J, Cheng E C, Long R C, *et al*. Noninvasive monitoring of embryonic stem cells *in vivo* with MRI transgene reporter[J]. Tissue Eng Part C Methods, 2009, 15(4): 739-747.

(**收稿**:2014-07-21;**修回**:2014-09-21)

(编辑 汪勤俭)