

腺病毒介导胰高血糖素样肽-1 受体在小鼠骨髓间充质干细胞表达的体外研究

张勤凤¹, 朱 剑², 徐宽枫¹, 陈 恒¹, 杨 涛¹, 武晓泓^{1*}

(¹南京医科大学第一附属医院内分泌科, 江苏 南京 210029; ²南京医科大学附属南京第一医院内分泌科, 江苏 南京 210006)

[摘要] 目的: 观察腺病毒介导胰高血糖素样肽-1 受体(GLP-1R)转染小鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BM-MSCs)的表达情况及 Exendin-4/GLP-1R 系统对 BM-MSCs 细胞增殖及凋亡的影响。方法: 利用 Ad.Max 系统构建含 GLP-1R 基因的腺病毒表达载体 Ad.GLP-1R, 感染小鼠 BM-MSCs。采用 RT-PCR、Western blot 和免疫荧光方法检测 GLP-1R 的表达情况。用 Exendin-4 刺激感染 Ad.GLP-1R 的 BM-MSCs, 通过细胞计数和流式细胞术检测细胞生长曲线、细胞周期及细胞凋亡的变化。结果: 腺病毒对小鼠 BM-MSCs 有较高的感染效率, 病毒感染复数(MOI)为 400 时, 感染率高达 89.5%。BM-MSCs 不表达 GLP-1R, 感染 Ad.GLP-1R 后有效表达 GLP-1R 基因和蛋白。Ad.GLP-1R 感染 BM-MSCs 后, Exendin-4 刺激组细胞生长曲线显著高于未刺激组($P < 0.05$)。细胞周期检测结果显示, 刺激组 G₀/G₁ 期细胞数显著下降、G₂/M 期细胞数明显升高, 增殖指数(S+G₂/M)亦显著增加(P 均 < 0.01)。而细胞凋亡率无明显变化。结论: Ad.GLP-1R 可以有效感染 BM-MSCs, 获得高表达 GLP-1R 的 BM-MSCs。Exendin-4 可以促进 Ad.GLP-1R 感染的 BM-MSCs 增殖。

[关键词] 胰高血糖素样肽-1 受体; 骨髓间充质干细胞; 增殖; 凋亡

[中图分类号] R587.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)03-310-05

Infection of adenovirus containing GLP-1R gene into mouse mesenchymal stem cells *in vitro*

ZHANG Qin-feng¹, ZHU Jian², XU Kuan-feng¹, CHEN Heng¹, YANG Tao¹, WU Xiao-hong^{1*}

(¹Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; ²Department of Endocrinology, Nanjing First Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 210006, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression of glucagon like peptide 1 receptor (GLP-1R) in mouse bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs) transfected by adenovirus and the effect of Exendin-4/GLP-1R on BM-MSCs proliferation and apoptosis after transfection. **Methods:** The adenoviral vector containing GLP-1R gene was constructed through the Ad.Max-system and infected the BM-MSCs. The expression of GLP-1R in Ad.GLP-1R-BM-MSCs was examined by RT-PCR, immunofluorescence, and Western blot, respectively. The effects of Exendin-4/GLP-1R on cell growth, cell cycle and apoptosis in Ad.GLP-1R-BM-MSCs were evaluated by cell counting and flow cytometry. **Results:** BM-MSCs could be effectively infected by adenovirus. When multiplicity of infection (MOI) was 400, the infection efficiency was 89.5%. Mouse BM-MSCs didn't express the GLP-1R gene natively. After infected with Ad.GLP-1R, the BM-MSCs expressed the GLP-1R gene and protein effectively, and the cell growth could be stimulated by Exendin-4. Compared with the unstimulated Ad.GLP-1R-BM-MSCs, G₀/G₁ phase cells in the Exendin-4 stimulation group decreased significantly, G₂/M phase cells and proliferation index (S+G₂/M) increased significantly ($P < 0.01$). But there was no significant difference in the apoptosis rate of two groups. **Conclusion:** Ad.GLP-1R can infect mouse BM-MSCs effectively and induce the expression of GLP-1R. Exendin-4 can promote the proliferation of BM-MSCs infected with Ad.GLP-1R.

[Key words] glucagon like peptide 1 receptor; bone marrow mesenchymal stem cells; proliferation; apoptosis

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(3): 310-314]

[基金项目] 国家自然科学基金(30971404, 81070621); 江苏省自然科学基金(BK2007251)资助

*通讯作者, E-mail: drxhww@njmu.edu.cn

骨髓间充质干细胞(BM-MSCs)具有极强的自我更新能力及多向分化潜能, 是修复骨、软骨等组

织或细胞损伤的首选种子细胞,也是基因治疗的理想靶细胞^[1]。近年研究显示,BM-MSCs 可以转分化为胰岛样细胞^[2-3],具有治疗糖尿病的潜能,但是分化效率、细胞成熟度和葡萄糖刺激的胰岛素分泌量均较低。胰高血糖素样肽-1(GLP-1)是一种主要由肠道 L 细胞产生的肠促胰岛素(incretin),与其特异性受体(GLP-1R)结合后通过上调(PDX-1)表达可以促进 β 细胞增殖和胚胎胰岛的成熟分化,抑制 β 细胞凋亡,血糖依赖性促进 β 细胞分泌胰岛素^[4-5]。Exendin-4 系天然 GLP-1 类似物,是含有 39 个氨基酸的多肽,它与 GLP-1R 的亲合力(IC₅₀ 约为 3 nmol/L)和生理活性都远高于 GLP-1(7~36)(IC₅₀ 约为 45 nmol/L),并具有相似的生物学作用。但对于 BM-MSCs 源性胰岛样细胞是否亦有促进分化成熟的作用尚不清楚。本研究以携带 GLP-1R 基因的腺病毒感染小鼠 BM-MSCs,观察目的基因表达及 Exendin-4/GLP-1R 系统对感染后 BM-MSCs 细胞增殖和凋亡的影响,为进一步研究 Exendin-4/GLP-1R 系统对 BM-MSCs 分化能力的影响奠定实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料

Ad.GFP、pDC316 质粒、骨架质粒(pBHGlox_E1, 3Cre)、Sal I 限制酶、Bgl II 限制酶、V-gene DNA 凝胶提取试剂盒、V-gene 质粒小量提取试剂盒、感受态大肠杆菌 DH-5 α 、Lipofectamine2000 脂质体均购自南京本元正阳基因技术有限公司。HEK293 细胞、小鼠 BM-MSCs 及培养基购自广州赛业生物科技有限公司。TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司。RT 试剂盒购自大连宝生物公司。PCR Master Mix 为美国 Fermentas 公司产品。琼脂糖购自美国 BIOWEST 公司。DNA marker 购自北京天根公司。引物由上海捷瑞生物公司合成。兔抗鼠 GLP-1R 抗体购于美国 Abcam 公司。

1.2 方法

1.2.1 Ad.GLP-1R 腺病毒载体的构建及鉴定

①pDC316-GLP-1R 质粒的构建及鉴定:针对小鼠 GLP-1R 基因,设计含有 Sal I 和 Bgl II 位点的上下游引物(上游引物:5'-GCCAGATCTATGGCCAGC-ACCCCAAGCCTC-3';下游引物:5'-GCCGTGACT-CAGCTGTAGGAAGTCTGCC-3'),目的片段 1 404 bp。用 TRIzol 试剂提取 C57BL/6 小鼠胰腺 RNA,按 RT 试剂盒说明书合成 cDNA,以 cDNA 为模板扩增出含有 GLP-1R 的 PCR 产物。采用 Sal I + Bgl II 双酶

切 pDC316 质粒和 GLP-1R 的 PCR 产物。用 V-gene DNA 凝胶提取试剂盒回收 pDC316 质粒片段(3.9 kb)和 GLP-1R 目的片段(1 404 bp)。连接产物热休克法转化感受态大肠杆菌 DH-5 α 。次日挑取平板上的单克隆菌落,放大培养后用 V-gene 质粒小量提取试剂盒提取质粒,双酶切鉴定、筛选正确的重组质粒;②双质粒(骨架质粒及穿梭质粒)共转染 HEK-293 细胞,同源重组产生重组腺病毒:取骨架质粒(pBHGlox_E1,3Cre)和穿梭质粒(pDC316-GLP-1R),用 Lipofectamine2000 脂质体共转染 HEK293 细胞,培养于含 5%胎牛血清的 DMEM 培养基中,每天观察细胞出毒迹象。出毒现象为细胞变大变圆,呈葡萄状,并开始出现明显噬斑。待细胞大部分病变并从底部脱落进行收毒。用 TCID₅₀ 法测定病毒滴度。

1.2.2 小鼠 BM-MSCs 的培养

C57BL/6 小鼠 BM-MSCs 细胞株经过相关质量检测,细胞生长状态、表面标记、成骨、成脂、成软骨诱导分化能力等均检测合格。用含 10%胎牛血清的 BM-MSCs 培养基培养,细胞传代用 0.125%胰酶 EDTA 消化。

1.2.3 Ad.GFP 感染 BM-MSCs 效率的测定

BM-MSCs 接种于 6 孔板(1×10^5 个/孔),培养 24 h。为获得最佳的病毒感染效率,按病毒感染复数(MOI)分别为 0、50、100、200、400、800 加入 Ad.GFP,5%CO₂,37℃孵育箱内培养。分别于感染 48 及 72 h 后在荧光显微镜下观察绿色荧光强度,消化细胞,重悬于 600 μ l PBS 中,流式细胞仪检测 GFP 阳性细胞比例。

1.2.4 BM-MSCs 感染 Ad.GLP-1R 后 Exendin-4 对细胞增殖的影响

细胞计数并绘制生长曲线:取生长良好的 Ad.GLP-1R 感染的 BM-MSCs,以 5.0×10^4 个/孔分别接种于 24 孔板,其中 1 组用 Exendin-4 刺激(刺激浓度 10 nmol/L),每天取 3 孔细胞消化计数,每孔计数 3 次,计算平均值,连续 8 d,描绘生长曲线。根据 Patterson 公式计算细胞在对数生长期的倍增时间= $T \times \lg 2 / \lg(N_t / N_0)$,其中 N 为细胞数,T 为细胞数由 N₀ 增至 N_t 所用的时间。

流式细胞仪测细胞周期:将 Ad.GLP-1R 感染的 BM-MSCs 接种于 6 孔培养板(1×10^5 个/孔),无血清培养液同步化 12 h 后加入 Exendin-4(刺激浓度为 0、1、10、100 nmol/L,n=3),刺激 72 h 后消化细胞,75%冰乙醇固定,细胞沉淀(1×10^5 个细胞/样品)加碘化丙啶综合染液避光染色 30 min,

上机检测,激发光波长 488 nm,用 Cellquest 软件程序自动获取 2×10^4 个细胞/样品,经 ModFitLT 软件程序分析细胞周期。计算增殖指数(proliferation index,PI)= $S+G_2/M$ 期细胞百分比,观察细胞增殖活性。

1.2.5 RT-PCR 检测感染 Ad.GLP-1R 后 BM-MSCs 的基因表达情况

用 TRIzol 试剂提取胰岛(阳参)、未感染 Ad.GLP-1R 及感染 Ad.GLP-1R 的 BM-MSCs 总 RNA。各取 1 μ g RNA,按 RT 试剂盒说明书合成 cDNA,PCR 鉴定 GLP-1R 的表达。上游引物:5'-TGAACCTGTTTGCATCCTTCA-3',下游引物:5'-ACTTGGCAAGCCTGCATTTGA-3',目的片段大小 513 bp。PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 5 min 后进行 30 个循环(95 $^{\circ}$ C 30 s 变性,61 $^{\circ}$ C 30 s 退火,72 $^{\circ}$ C 45 s 延伸),最后 1 个循环后再 72 $^{\circ}$ C 末次延伸 10 min,1.5%琼脂糖凝胶电泳观察。

1.2.6 Western blot 检测感染 Ad.GLP-1R 的 BM-MSCs GLP-1R 蛋白表达情况

用冷 PBS 清洗细胞 3 次,刮下细胞,转入 1.5 ml EP 管,9 000 r/min,4 $^{\circ}$ C 离心 5 min;弃上清,加入合适体积的细胞裂解液,置摇床冰上裂解 30 min;9 000 r/min,4 $^{\circ}$ C 离心 5 min,取上清;BCA 试剂盒测蛋白浓度;加入 5 \times loading buffer 煮沸变性后,SDS-PAGE 电泳、转膜,5%脱脂奶粉 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h,弃封闭液,兔抗鼠 GLP-1R 一抗(1:500 稀释),4 $^{\circ}$ C 过夜, TBST 洗膜 10 min \times 3 次,加入稀释的羊抗兔二抗(1:10 000 稀释),37 $^{\circ}$ C 1 h, TBST 洗膜 10 min \times 3 次,曝光。

1.2.7 免疫荧光检测感染 Ad.GLP-1R 后 BM-MSCs 的蛋白表达情况

将感染及未感染 Ad.GLP-1R 的 BM-MSCs 制成细胞爬片。10%福尔马林室温固定 20 min,PBS 5 min 洗 3 次,0.1% Triton X-100 室温孵育 10 min,PBS 5 min 洗 3 次,5%BSA 封闭 1 h,加一抗(兔抗鼠 GLP-1R 抗体 1:500 稀释)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,PBS 5 min 洗 3 次,加 Dylight488 二抗(驴抗兔 1:100 稀释)室温孵育 1.5 h,PBS 5 min 清洗 3 次后荧光显微镜下观察并拍照。

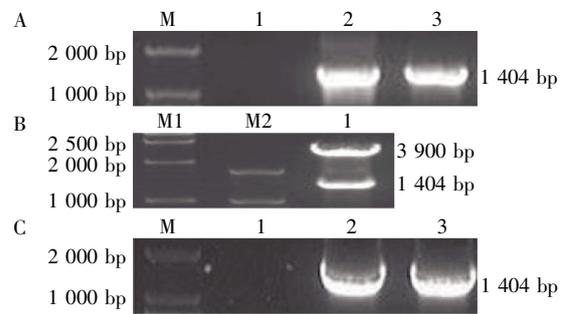
1.3 统计学方法

SPSS13.0 统计软件对数据进行分析,所有数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)形式表示,对应天数细胞计数的比较采用成组 *t* 检验进行分析;多组数据比较采用单因素方差分析,采用 LSD 法进行两两比较, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 重组 Ad.GLP-1R 腺病毒载体的鉴定

GLP-1R 与 pDC316 载体的连接产物经 PCR 鉴定,电泳结果见 1 404 bp 大小片段(图 1A)。重组质粒 pDC316-GLP-1R 经 *Sal* I +*Bgl* II 双酶切鉴定,切出了 1 404 bp 小片段及 3.9 kb 大片段(图 1B)。骨架质粒(pBHGlox_E1,3Cre)及穿梭质粒(pDC316-GLP-1R)共转染 HEK293 细胞,同源重组产生重组腺病毒。用病毒上清再次感染 HEK293 细胞,取含病毒上清进行 PCR 鉴定(图 1C)。用 TCID₅₀ 法测定其病毒滴度为 1.26×10^{10} TU/ml。



A:重组质粒 pDC316-GLP-1R 的菌落 PCR 鉴定(M:marker;1:阴性对照;2:C57BL/6 小鼠胰腺;3:pDC316-GLP-1R 质粒);B:重组质粒 pDC316-GLP-1R 酶切鉴定(M1,M2:marker;1:酶切片段);C:Ad.GLP-1R 腺病毒载体的鉴定(M:marker;1:阴性对照;2:阳性对照;3:Ad.GLP-1R)。

图 1 Ad.GLP-1R 腺病毒载体的鉴定

Figure 1 Identification of recombinant adenoviruses plasmid Ad.GLP-1R

2.2 Ad.GFP 感染 BM-MSCs 的效率测定

Ad.GFP 按 MOI 为 0、50、100、200、400、800 分别感染 BM-MSCs,经流式细胞仪测定感染率在 44.7%~95.0%之间。当 MOI=800 时,感染率达到 95.0%,但 Ad.GLP-1R 对 BM-MSCs 存在一定的毒性作用。而 MOI=400 时,72 h 后感染率亦较高,可达到 89.5%;荧光显微镜下可见 GFP 的表达明显增强,且 BM-MSCs 细胞形态正常,故后续实验均采用该条件感染细胞(图 2)。

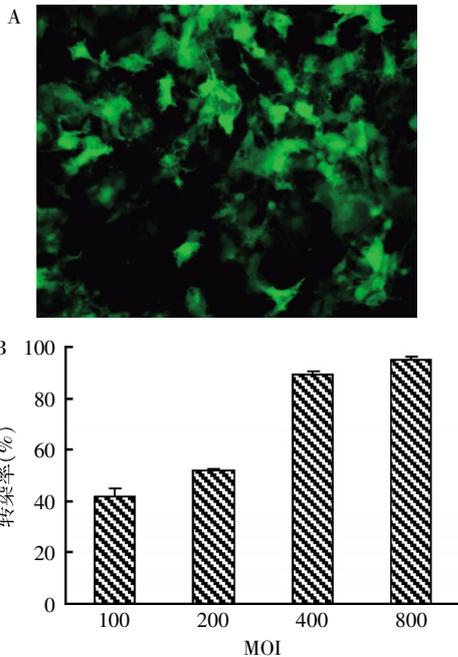
2.3 Ad.GLP-1R 感染 BM-MSCs 后 GLP-1R 表达情况

感染 Ad.GLP-1R(MOI=400)72 h 的 BM-MSCs 可以检测到 GLP-1R 基因及蛋白的高表达,而未感染的 BM-MSCs 则无 GLP-1R 的表达(图 3)。

2.4 感染 Ad.GLP-1R 后 Exendin-4 对 BM-MSCs 细胞增殖和凋亡的影响

对 Ad.GLP-1R 感染的 BM-MSCs 进行流式细胞术检测显示,与空白对照组相比,10 nmol/L Ex-

endin-4 刺激组 G₀/G₁ 期细胞数显著下降, G₂/M 期细胞数明显升高, PI 亦显著增加 (P 均 < 0.01), 而细胞凋亡率无显著变化 (表 1)。10 nmol/L Exendin-4 刺激后, Ad.GLP-1R 感染的 BM-MSCs 细胞生长曲线显著高于空白对照组 ($P < 0.05$), 细胞倍增时间约为 29~32 h, 而空白对照组仅为 35~36 h (图 4)。



A: 感染 Ad.GFP 后荧光显微镜下观察 ($\times 200$); B: 流式细胞仪检测不同 MOI 感染 72 h 后感染效率。

图 2 Ad.GFP 感染 BM-MSCs 后感染效率测定

Figure 2 The infection efficiency of BM-MSCs after infected by Ad.GFP

3 讨论

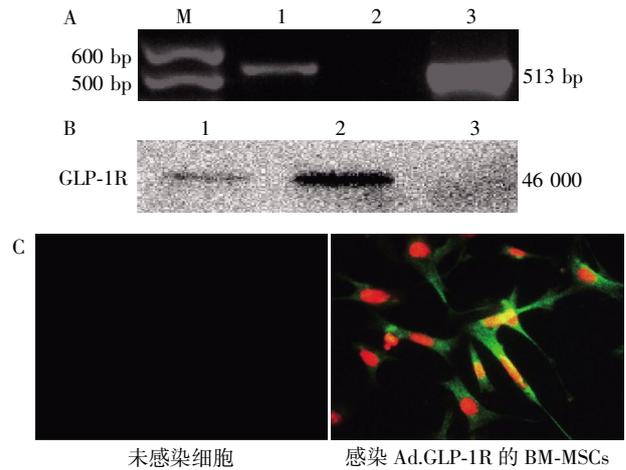
GLP-1R 属于 G 蛋白偶联受体 B 家族 (分泌素家族) 中的胰高血糖素受体亚家族, 广泛表达在人和鼠的胰岛、肺、脑、胃、心脏及肾脏, 其中尤以胰岛、心脏和肺中的表达量较高。GLP-1 与 GLP-1R 结合后, 偶联的 G 蛋白 α 亚基与 β 、 γ 亚基解离, 并分别介导胞内不同的信号通路, 在机体多部位发挥不同的生理作用^[6]。它能增加胰岛素的生物合成及葡萄糖依赖性促胰岛素分泌, 刺激 β 细胞增生和再

表 1 不同浓度 Exendin-4 对 Ad.GLP-1R 感染的 BM-MSCs 细胞周期的影响

Table 1 The effect of the different concentrations of Exendin-4 on the cell cycle of Ad.GLP-1R-BM-MSCs (%)

Exendin-4 (nmol/L)	G ₀ /G ₁ 期	S 期	G ₂ /M 期	PI	Apoptosis
0	76.06 \pm 0.70	14.38 \pm 0.54	9.56 \pm 0.50	23.94 \pm 0.70	7.47 \pm 1.17
1	71.16 \pm 0.73	18.60 \pm 1.10	10.24 \pm 0.69	28.84 \pm 0.73	15.32 \pm 4.42
10	62.36 \pm 1.66*	20.27 \pm 2.06	17.38 \pm 1.14*	37.64 \pm 1.66*	11.53 \pm 0.33
100	66.29 \pm 1.47	18.07 \pm 1.69	15.65 \pm 0.22	33.72 \pm 1.47	8.79 \pm 0.82

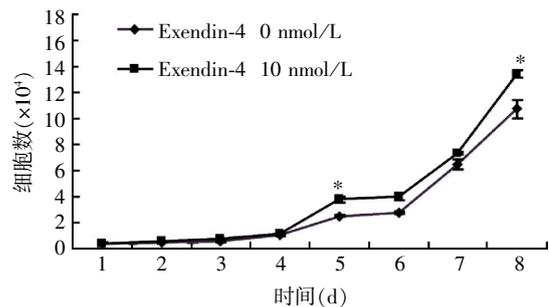
与空白对照组相比, * $P < 0.05$ 。



A: RT-PCR 检测 BM-MSCs 中 GLP-1R 基因的表达 (M: marker; 1: 阳性对照; 2: BM-MSCs; 3: Ad.GLP-1R-BM-MSCs); B: Western blot 检测 BM-MSCs 中 GLP-1R 蛋白的表达 (1: 阳性对照; 2: Ad.GLP-1R-BM-MSCs; 3: BM-MSCs); C: 免疫荧光检测 BM-MSCs 中 GLP-1R 蛋白的表达 ($\times 200$)。

图 3 Ad.GLP-1R 感染 BM-MSCs 后的表达情况

Figure 3 The GLP-1R gene and protein expression in BM-MSCs infected by Ad.GLP-1R



相同时间点两组比较, * $P < 0.05$ 。

图 4 Ad.GLP-1R 感染 BM-MSCs 后的生长曲线

Figure 4 The growth curve of BM-MSCs infected by Ad.GLP-1R

生, 抑制其凋亡并抑制胰高血糖素的分泌。在中枢系统其可抑制食欲, 降低饥饿性糖尿病小鼠的高胰岛素状态, 从而减轻胰岛素抵抗^[7]。在胃肠道系统其可抑制胃肠道蠕动和胃液分泌, 延迟胃排空。最近, Sanz 等^[8]发现, 人 BM-MSCs 亦表达 GLP-1R, GLP-1 可以促进人 BM-MSCs 增殖, 抑制其凋亡。而本实验室通过 RT-PCR 及 Western blot 检测, 并未发现小鼠

BM-MSCs 表达 GLP-1R 基因及蛋白。这些差异可能源于不同的种属。为此,本研究在小鼠 BM-MSCs 中引入 GLP-1R 基因,使其稳定高表达 GLP-1R,观察 Exendin-4/GLP-1R 系统对 BM-MSCs 增殖和凋亡的影响。

目前介导外源基因表达的载体有脂质体、慢病毒、腺病毒等。利用脂质体转染基因的效率变化很大,且必要时还需使用适当的抗生素进行筛选,这可能会对细胞产生影响。有研究发现,利用脂质体转染 GFP 的质粒表达载体进入人 MSCs 的效率只有 5% 左右,且对细胞生长状态有一定影响^[9]。慢病毒载体整合到细胞染色体上,可以稳定感染细胞,但是其只能感染正在分裂的细胞,并且有插入突变及激活癌基因的危险,用于治疗比较危险。腺病毒载体以其宿主范围广(增殖和非增殖细胞都能够感染和表达);感染效率高,表达时间长;不整合到宿主染色体中,不会引起基因突变;能同时表达多个基因;易制备高滴度的腺病毒等优点而成为目前人类基因治疗研究中最理想的病毒载体之一^[10]。但是,在腺病毒的实际应用中,宿主的免疫反应可能是导致腺病毒载体表达短暂的关键因素,为进一步提高疗效就必须研究新一代的载体。腺病毒主要有 Ad.Max 和 Ad.Easy 系统。与目前使用最普及的 Ad.Easy 系统^[11]相比,Ad.Max 系统有一定的优势:其通过 Cre/loxP 获得重组病毒,这个过程发生在 HEK-293 细胞中,从而避免在细菌中重组;操作简便;目的基因的表达水平高;只需要 2~4 周就能完成质粒构建、重组和出毒,成功率大于 98%(其中 95% 的克隆含有目的基因)。因在真核细胞中重组出毒,保持了对腺病毒的生存压力,有助于重组腺病毒基因组的完整性^[12]。综上考虑,本研究选用 Ad.Max 系统构建病毒载体。Ad.GFP 感染 BM-MSCs 后荧光显微镜下观察到带有绿色荧光的细胞与光镜下见到的细胞形态结构相似,荧光可持续 4~5 周。另外,应用 Ad.GFP 感染 BM-MSCs,在 MOI 400~800 的范围内可以获得较高的感染效率,均在 90% 左右,并且 MOI=400 为较合适的感染条件,这说明 BM-MSCs 对于腺病毒是易感细胞。本实验利用 Ad.Max 系统成功构建了含 GLP-1R 的腺病毒载体,通过 RT-PCR 及 Western blot 检测,感染 Ad.GLP-1R 的小鼠 BM-MSCs 可稳定高表达外源性 GLP-1R 基因和蛋白。予 10 nmol/L Exendin-4 刺激可显著促进 Ad.GLP-1R 感

染 BM-MSCs 的增殖,但对其细胞凋亡无显著影响。

[参考文献]

- [1] Pittenger MF, Mackay A, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells [J]. *Science*, 1999, 284(5411): 143-147
- [2] Sun Y, Chen L, Hou XG, et al. Differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from diabetic patients into insulin-producing cells *in vitro* [J]. *Chin Med J*, 2007, 120(9): 771-776
- [3] Wu XH, Liu CP, Xu KF, et al. Reversal of hyperglycemia in diabetic rats by portal vein transplantation of islet-like cells generated from bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13 (24): 3342-3349
- [4] Drucker DJ, Nauck MA. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes [J]. *Lancet*, 2006, 368 (9548): 1696-1705
- [5] Lee SH, Lee S, Youn YS. Synthesis, characterization, and pharmacokinetic studies of PEGylated glucagon-like peptide-1 [J]. *Bioconjug Chem*, 2005, 16(2): 377-382
- [6] 周彩红, 胡慧, 王明伟. 胰高血糖素样肽 1 受体—治疗糖尿病新药的研究热点 [J]. *生命科学*, 2004, 16(2): 90-95
- [7] Knauf C, Cani PD, Ait-Belgnaoui A, et al. Brain glucagon-like peptide 1 signaling controls the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and reduces energy expenditure [J]. *Endocrinology*, 2008, 149(10): 4768-4777
- [8] Sanz C, Vázquez P, Blázquez C, et al. Signaling and biological effects of glucagon-like peptide 1 on the differentiation of mesenchymal stem cells from human bone marrow [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2010, 298 (3): E634-643
- [9] 单志新, 林秋雄, 李晓红, 等. 腺病毒表达载体对骨髓间充质干细胞分化能力的影响 [J]. *南方医科大学学报*, 2008, 28(7): 1132-1135
- [10] Davis AR, Wivel NA, Palladino JL, et al. Construction of adenoviral vectors [J]. *Mol Biotechnol*, 2001, 18(1): 63-70
- [11] He TC, Zhou S, da Costa LT, et al. A simplified system for generating recombinant adenoviruses [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(5): 2509-2514
- [12] Douglas JT. Adenoviral vectors for gene therapy [J]. *Mol Biotechnol*, 2007, 36(1): 71-80

[收稿日期] 2011-08-31