

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.06.012 [http://www.crter.org]

张海宁, 丁昌荣, 吕成昱, 王英振, 周峰, 续宗耀. 人胰岛素样生长因子1基因转染脂肪源性干细胞的效应[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(6):1018-1023.

人胰岛素样生长因子1基因转染脂肪源性干细胞的效应***

张海宁¹, 丁昌荣², 吕成昱¹, 王英振¹, 周峰¹, 续宗耀¹

1 青岛大学医学院附属医院关节外科, 山东省青岛市 266003

2 青岛大学医学院附属医院东区特检科, 山东省青岛市 266003

文章亮点:

- 1 实验构建含人胰岛素样生长因子1基因的双顺反子真核表达载体 pIRES2-EGFP-hIGF-1, 并利用阳离子脂质体 Lipofectamine 2000 介导转染在体外培养了人脂肪源性干细胞。
- 2 同时证实了外源性人胰岛素样生长因子1基因在细胞内外的表达, 并且分泌至细胞上清的人胰岛素样生长因子1可达到较高的浓度。相比其生理浓度, 本实验所分泌达到的浓度有望取得相应的治疗效应。
- 3 本实验选择阳离子脂质体作为基因转染的载体, 采用基因修饰的脂肪源性干细胞植入体内后有望表达相对高水平的人胰岛素样生长因子1蛋白质, 从而在一定时间内发挥人胰岛素样生长因子1的积极生物学活性。

关键词:

干细胞; 脂肪干细胞; 胰岛素样生长因子; 脂肪源性干细胞; 基因; 转染; 细胞增殖; 国家自然科学基金; 干细胞图片文章

摘要

背景: 人胰岛素样生长因子1基因对脂肪源性干细胞的增殖和分化也可能产生有效作用。

目的: 验证人胰岛素样生长因子1基因转染对体外培养的脂肪源性干细胞的效应。

方法: 构建含人胰岛素样生长因子1基因的双顺反子真核表达载体 pIRES2-EGFP-hIGF-1, 利用阳离子脂质体 Lipofectamine 2000 介导转染体外培养的人脂肪源性干细胞。观察基因转染后细胞增殖及形态的变化, 倒置荧光显微镜观测标记基因增强绿色荧光蛋白的表达并计算转染效率, 酶联免疫吸附试验检测培养上清中人胰岛素样生长因子1的浓度, 免疫组织化学染色及 RT-PCR 检测人胰岛素样生长因子1的表达, 流式细胞仪检测转染前后细胞周期的变化。

结果与结论: 测序及酶切实证真核表达载体 pIRES2-EGFP-hIGF-1 构建正确。体外培养的脂肪源性干细胞为多种形态并存, 转染后 6 h 检测到有 EGFP 的表达, 至 60 h 达到高峰, 转染效率为(16±3)%。细胞上清中人胰岛素样生长因子1的浓度在 60 h 达到 22.65 μg/L。免疫组织化学染色及 RT-PCR 均检测到人胰岛素样生长因子1的表达。转染后的细胞分裂增殖加快, 细胞群体倍增时间缩短, S 期细胞比例增多。证实人胰岛素样生长因子1基因可有效转染脂肪源性干细胞并表达人胰岛素样生长因子1蛋白质, 同时可促进细胞增殖。

Effects of human insulin-like growth factor 1 gene trasfection on adipose-derived stem cells

Zhang Hai-ning¹, Ding Chang-rong², Lü Cheng-yu¹, Wang Ying-zhen¹, Zhou Feng¹, Xu Zong-yao¹

1 Department of Joint Surgery, Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266003, Shandong Province, China

2 Department of Special Inspection in East District, Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266003, Shandong Province, China

张海宁☆, 男, 1976年生, 山东省潍坊市人, 汉族, 2005年上海交通大学医学院毕业, 博士, 副主任医师, 主要从事关节领域修复重建外科治疗研究。zhaining@hotmail.com

通讯作者: 王英振, 硕士, 主任医师, 青岛大学医学院附属医院关节外科, 山东省青岛市 266003 hunterzhn@yahoo.com.cn.

中图分类号:R394.2
文献标识码:A
文章编号:2095-4344
(2013)06-01018-06

收稿日期: 2012-05-09
修回日期: 2012-06-10
(20111209002/W · S)

Zhang Hai-ning☆, M.D.,
Associate chief physician,
Department of Joint Surgery,
Affiliated Hospital of Qingdao
University Medical College,
Qingdao 266003, Shandong
Province, China
zhhaining@hotmail.com

Corresponding author: Wang
Ying-zhen, Master, Chief
physician, Department of
Special Inspection in East
District, Affiliated Hospital of
Qingdao University Medical
College, Qingdao 266003,
Shandong Province, China
hunterzhn@yahoo.com.cn

Supported by: the National
Natural Science Foundation of
China, No. 81171774*,
81272056*

Received: 2012-05-09
Accepted: 2012-06-10

Abstract

BACKGROUND: Human insulin-like growth factor 1 gene produces effects on the proliferation and differentiation of adipose-derived stem cells.

OBJECTIVE: To investigate the possible effects of human insulin-like growth factor 1 gene transfection on the adipose-derived stem cells cultured *in vitro*.

METHODS: The cDNA for human insulin-like growth factor 1 was cloned into the recombinant eukaryotic expression plasmid pIRES2-EGFP-hIGF-1. The adipose-derived stem cells were derived from adipose tissue and cultured *in vitro*, and then the plasmid was transfected into cells by Lipofectamine 2000. After gene transfection, changes in cell proliferation and morphology were observed. Through the use of inverted fluorescent microscopy, the marker gene coding enhanced green fluorescent protein was observed and the transfection efficiency was determined. The human insulin growth factor 1 concentration in the supernatant fluids was measured by ELISA. The expression of human insulin-like growth factor 1 was detected by immunohistochemical staining and RT-PCR. The changes in cell cycle before and after transfection were assessed by flow cytometry.

RESULTS AND CONCLUSION: The recombinant eukaryotic expression plasmid pIRES2-EGFP-hIGF-1 was confirmed by gene sequencing and enzyme digestion. The adipose-derived stem cells cultured *in vitro* were in multiple shapes. The expression of enhanced green fluorescent protein was detected for the first time at 6 hours after transfection and peaked at 60 hours, with transfection efficacy of $16\pm 3\%$. The concentration of insulin-like growth factor 1 in the supernatant fluid was $22.65\ \mu\text{g/L}$ at 60 hours after transfection. Human insulin growth factor 1 expression was detected by immunohistochemical staining and RT-PCR. Division and proliferation of the cells were accelerated after gene transfection, leading to the decrease of the population doubling time, and the increase of the percentage of stem cells in the S stage. These results indicate that human insulin growth factor 1 gene can be transfected efficiently into the adipose-derived stem cells by liposome and human insulin-like growth factor 1 protein can be secreted into the supernatant fluid, therefore accelerating the proliferation of the cells.

Key Words: stem cells; adipose-derived stem cells; insulin-like growth factor; gene; transfection; cell proliferation; National Natural Science Foundation of China; stem cell photographs-containing paper

Zhang HN, Ding CR, Lü CY, Wang YZ, Zhou F, Xu ZY. Effects of human insulin-like growth factor 1 gene transfection on adipose-derived stem cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(6):1018-1023.

0 引言

人胰岛素样生长因子1是一类具有广泛生物学活性的多种组织细胞的有丝分裂原^[1-3]。能与特异性的受体相结合调节机体的生长发育,人胰岛素样生长因子1还可以改善糖代谢和脂质代谢,应用人胰岛素样生长因子1蛋白可缓解糖尿病的代谢紊乱,降低血糖^[4]。由于人胰岛素样生长因子1蛋白在体内的代谢迅速,半衰期很短,限制了其临床应用,单次大剂量应用又可产生低血糖等并发症,因此探索体内体外模式的人胰岛素样生长因子1相关基因治疗具有较好前景。实验观察了人胰岛素样生长因子1基因转染对体外培养的脂肪源性干细胞的影响及其表达。

1 材料和方法

设计: 分组对比细胞学实验。

时间及地点: 实验于2011年2月至2012年3月在青岛大学医学院附属医院中心实验室(BSL-3级)完成。

材料:

Main experimental reagents and instruments:

材料	来源
引物	上海生工公司
pIRES2-EGFP	Roche company
Lipofectamine 2000	nvitrogen company
IELISA 试剂盒	Sigma company

方法:

人胰岛素样生长因子1基因的扩增及真核表达载体的制备: 参照文献[5]报道的人胰岛素样生长因子1的全长基因序列设计引物。引物1: 5'GCC TCG AGG AAG ATG CAC ACC ATG TCC TC 3'; 引物2: 5'GCG AAT TCC TAC ATC CTG TAG TTC TTG TTT C 3'。以人肝细胞cDNA文库为模板, 用PCR方法扩增人胰岛素样生长因子1全长基因的开放阅读框部分。PCR产物行TA克隆后进行测序鉴定。用限制性内切酶EcoR I 及Xho I 分别对PMD18-T-hIGF-1质粒以及真核表达载体pIRES2-EGFP进行双酶切, 定向连接形成重组真核表达载体pIRES2-EGFP-hIGF-1。对双酶切鉴定以及PCR鉴定正确的质粒大量抽提后保存备用。

脂肪源性干细胞体外分离培养: 在取得患者同意的前提下, 无菌切取髌关节手术患者皮下脂肪组织约10 mL, 用2倍体积D-Hank's平衡盐液漂洗3遍, 剪成1 mm×1 mm×1 mm大小, 加入0.2% I型胶原酶5 mL置于37 °C温箱内消化0.5 h, 低温高速离心机内1 000 r/min离心10 min弃上清, 加入160 mmol/L NH₄Cl约5 mL裂解红细胞10 min, 筛网过滤, 按8 000/cm²种植于50 mL培养瓶中。37 °C、体积分数5%CO₂、饱和湿度培养。每隔两三天换液1次, 融合达80%以上时传代。取部分2代细胞制成细胞爬片行油红O染色。锥虫蓝拒染试验检测细胞活性。测定细胞群体倍增时间(PDT)。

脂肪源性干细胞鉴定: 对培养皿中的附壁细胞进行油红O和苏木精染色检测。取第3代细胞调整细胞浓度为1×10⁹ L⁻¹, 各取200 μL, 分别加入荧光FITC或PE标记的鼠抗人单抗CD29、CD34、CD45、CD90及相应荧光素标记的同型对照抗体小鼠IgG1各10 μL, 室温避光孵育20 min, 用流式细胞仪(FACS Calibur, BD公司)检测, 每份样品采集细胞数≥10 000个, CellQuest软件分析结果。

阳离子脂质体介导重组真核表达质粒pIRES2-EGFP-hIGF-1转染: 将约2×10⁵细胞接种于35 mm²培养皿内, 培养至60%–80%融合时转染。按3:1比例制备Lipofectamine 2000和质粒混合物, 室温孵育后加入细胞中混匀。同时设立空载体对照组(Lipofectamine 2000介导转染空载体pIRES2-EGFP)、单纯脂质体组(仅加入Lipofectamine 2000)和空白对照组(加入同体积的α-MEM培养基), 观察空载体和转染试剂对细胞的影响。

转染结果倒置荧光显微镜观察: 基因转染后, 在暗室中用倒置荧光显微镜分别在转染后和传代后24 h观察细胞中增强绿荧光蛋白(EGFP)的表达情况, 采用488 nm波长

紫外光激发。

转染效率的计算: 沿6孔板垂直与水平经过连续视野计数EGFP阳性的细胞数, 共观察约20视野, 转染效率=(EGFP表达阳性的细胞数/计数细胞总数)×100%。

培养上清人胰岛素样生长因子1浓度测定: 取转染后72 h的培养上清, 采用酶联免疫吸附试验检测分泌的人胰岛素样生长因子1浓度。

人胰岛素样生长因子1免疫组织化学染色: 转染后72 h细胞爬片, 丙酮固定后行人胰岛素样生长因子1免疫组织化学染色。

RT-PCR检测人胰岛素样生长因子1的表达: 参照GeneBank(X00173)公布的人胰岛素样生长因子1全长cDNA序列设计人胰岛素样生长因子1引物。抽提转染细胞总RNA, 行MMLV一步法RT-PCR检测人胰岛素样生长因子1的表达。

流式细胞仪检测: 收集转染前及转染后48 h的细胞行流式细胞仪检测细胞周期的分布。

主要观察指标: 人胰岛素样生长因子1基因转染对脂肪源性干细胞的增殖、分化产生的影响, 以及目的基因和标记基因在细胞中的表达情况。

2 结果

2.1 人胰岛素样生长因子1全长基因片段的获得与鉴定 PCR产物凝胶电泳可见扩增条带的大小与预期一致。测序结果证实基因序列与GeneBank公布的人人胰岛素样生长因子1的全长基因序列完全一致。双酶切电泳鉴定证实重组真核表达载体pIRES2-EGFP-hIGF-1的构建正确。

2.2 脂肪源性干细胞的体外培养及转染后的变化 在接种24 h后, 细胞贴附于培养皿中表现为长梭形, 三角形或多角形等形态, 见图1。在5–7 d后形成70%–80%融合。附壁细胞不能为油红O和苏木精着色, 表明在胞质中并无脂质, 与脂肪谱系细胞无相关性。脐血间充质干细胞不表达造血标志CD34、CD45; 可表达CD29、CD90等。计算转染前细胞群体倍增时间约为51.2 h。转染后的细胞分裂增殖加快, 细胞分裂相比比例增多, PDT平均缩短为39.5 h。

2.3 转染后倒置荧光显微镜观察结果 细胞转染后6 h后即可见到部分细胞表达EGFP, 见图2, 此后数量逐渐增多, 到60 h达到高峰。表达荧光的细胞分布欠均匀,

在传代后仍可见到有EGFP的表达。多视野阳性细胞计数转基因效率为(16±3)%。

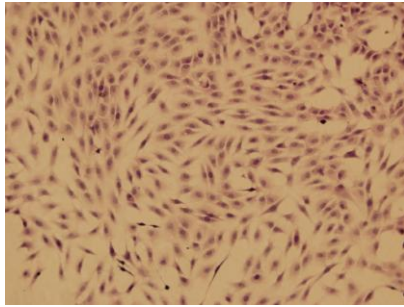


图1 体外培养的脂肪源性干细胞, 细胞呈长梭形, 三角形或多角形 (苏木精-伊红染色, ×10)

Figure 1 The *in vitro* cultured adipose-derived stem cells, presenting with long-shuttle-shaped, triangular or polygonal appearance (hematoxylin-eosin staining, ×10)

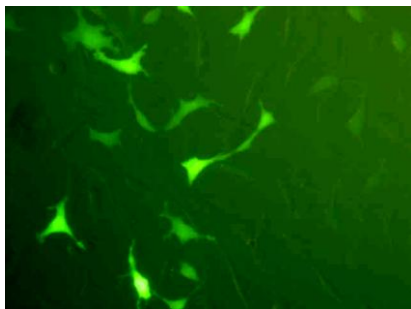


图2 基因转染后细胞内增强绿荧光蛋白高强度表达(倒置荧光显微镜, ×40)

Figure 2 High level of enhanced green fluorescent protein expression in cells transfected with recombinant plasmid (inverted fluorescence microscope, ×40)

2.4 人胰岛素样生长因子1分泌浓度检测结果 酶联免疫吸附试验检测不同时间培养上清中分泌的人胰岛素样生长因子1质量浓度, 空白对照组为(2.65±1.3) μg/L。基因转染后6 h起升至4.55 μg/L, 之后随时间延长逐渐升高, 在60 h达到22.65 μg/L, 之后质量浓度逐渐下降。空载体对照组(pIRES2-EGFP)、空白对照组(生理盐水组)及单纯转染试剂组(Lipofectamine 2000)的上清中人胰岛素样生长因子1的质量浓度无明显差异, 并且无明显细胞脱落、死亡等细胞毒性现象。

2.5 人胰岛素样生长因子1免疫组织化学染色结果 转基因后72 h细胞爬片人胰岛素样生长因子1免疫组织化学染色可见在细胞浆中有棕黄色深染的颗粒出现, 见

图3。

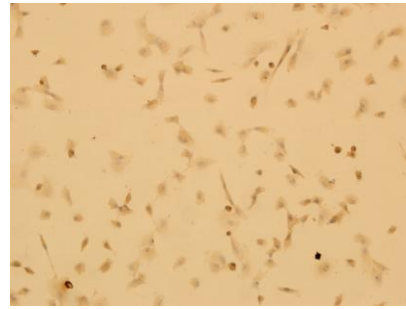


图3 基因转染后人胰岛素样生长因子1 免疫组织化学染色可见脂肪源性干细胞的细胞浆中棕黄色阳性颗粒 (×10)

Figure 3 Brown granules in the cytoplasm of adipose-derived after gene transfection as shown by immunohistochemical staining for insulin-like growth factor 1 (×10)

2.6 RT-PCR检测人胰岛素样生长因子1表达 发现在409 bp位置有扩增产物条带出现。

2.7 流式细胞仪检测细胞周期 转染前细胞以G₁期为主, 在基因转染之后, S期细胞比例升高。

3 讨论

人胰岛素样生长因子1是胰岛素样生长因子家族中的重要成员, 与胰岛素分子具有高度同源性, 其受体在结构和功能上也类似胰岛素受体, 其作用的发挥受人胰岛素样生长因子1结合蛋白的调节^[6-8]。人胰岛素样生长因子1具有广泛的生物学活性, 在胚胎发育中的作用甚至比生长激素更为重要, 主要生理作用是促进机体的生长发育和物质代谢, 促进细胞的分裂增殖, 有胰岛素样的代谢调节作用, 与糖尿病关系密切^[9-12]。

由于胰岛素样生长因子1具有强大生物学活性, 近年来在治疗内分泌系统、泌尿系统、神经系统及肌肉骨骼系统疾病中发挥着越来越重要的作用^[13-16]。Thrailkill使用INS和人胰岛素样生长因子1联合治疗43例1型糖尿病儿童和223例青少年和成人1型糖尿病^[17-18]。结果显示联合治疗比单独使用INS能更好地改善1型糖尿病的血糖控制, 使用人胰岛素样生长因子1可纠正胰岛素样生长因子1的不足, 降低胰岛素样生长因子结合蛋白1的水平并使血循环中的生长激素水平呈下降的趋势。但由

于人胰岛素样生长因子1的代谢周期极短, 大剂量一次性使用容易产生并发症影响治疗, 且费用高昂, 需要重复使用, 限制了临床应用。基因治疗为解决这一难题开拓了新的思路, 将基因利用体外或体内途径导入人体内, 在一段时间内高效表达目的基因从而发挥治疗作用。可为人胰岛素样生长因子1的基因治疗奠定物质基础。

人胰岛素样生长因子1的成熟肽由70个氨基酸组成, 在GeneBank中公布的胰岛素样生长因子1全长cDNA序列中, 在编码成熟肽的210个碱基对之前, 尚有约75 bp的信号肽序列, 这对于介导人胰岛素样生长因子1的分泌是必需的结构。因此, 本实验将此段信号肽序列连同成熟肽的编码区序列进行一并扩增, 以使人胰岛素样生长因子1作为分泌性蛋白质发挥作用。本实验采用的真核表达载体pIRES2-EGFP在标记基因EGFP的上游引入了一个内核糖体进入位点(internal ribosome entry site, IRES)。作为一个双顺反子表达载体可快速有效地选择表达目的基因的阳性克隆, 可同时表达目的基因及报告基因, 由于两者共用一个启动子, 因此所有表达选择标记的转染细胞也同时表达目的基因。由于在同一条mRNA链上以2个阅读框进行翻译, 因此所表达的蛋白质为非融合蛋白, 避免了和标记蛋白的融合而对生长因子生物学活性的发挥造成影响。

脂肪源性干细胞是由Zuk等^[19]从人抽吸的脂肪中分离并证实有多向分化潜能的间充质干细胞, 已被诱导成为肌肉细胞, 心肌细胞、神经细胞和软骨细胞等。脂肪源性干细胞还具有来源广泛, 取材分离方便, 对机体损伤小等特点, 方便临床应用。本实验将人胰岛素样生长因子1基因脂肪源性干细胞转染后, 细胞分裂增殖加快, PDT缩短, S期细胞比例也有相应升高, 表明细胞DNA及蛋白质等的合成功能较旺盛。同时证实了外源性人胰岛素样生长因子1基因在细胞内外的表达, 并且分泌至细胞上清的人胰岛素样生长因子1可达到较高的浓度。相比其生理浓度, 本实验所分泌达到的浓度有望取得相应的治疗效应。

自从1994年第一例非致命性疾病临床基因治疗以来^[20], 脂质体成为美国食品及药物管理局推荐临床基因治疗的首选载体。尽管脂质体的转染效率及蛋白质的分泌水平不如病毒载体, 但因其无毒、无免疫原性, 基因

不整合入宿主基因组, 因此在临床应用上相对于病毒载体更加安全。本实验选择阳离子脂质体作为基因转染的载体, 采用基因修饰的脂肪源性干细胞植入体内, 有望表达相对高水平的人胰岛素样生长因子1蛋白质, 从而在一定时间内发挥人胰岛素样生长因子1积极的生物学活性。

基金资助: 国家自然科学基金项目资助课题(81171774)。

课题名称: siRNA 基因沉默与诱导双向基因治疗关节炎的软骨、滑膜生物学响应及 ex vivo 系统转基因在体示踪研究。国家自然科学基金项目(81272056)。课题名称: hUCB-MSCs 归巢介导 LPD 靶向系统性组合基因治疗的软骨生物学响应及空化效应调控表达。

作者贡献: 第一作者进行实验设计, 第二、三作者进行实施, 第三作者进行统计学分析。第一作者成文, 通讯作者进行审校, 第一作者及通讯作者对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 参与实验的个体在充分了解本治疗方案的前提下自愿提供脂肪组织, 并签署“知情同意书”; 治疗方案获医院伦理委员会批准。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

4 参考文献

- [1] Fortier LA, Barker JU, Strauss EJ, et al. The role of growth factors in cartilage repair. Clin Orthop Relat Res. 2011; 469(10):2706-2715.
- [2] Spiller KL, Liu Y, Holloway JL, et al. A novel method for the direct fabrication of growth factor-loaded microspheres within porous nondegradable hydrogels: Controlled release for cartilage tissue engineering. J Control Release. 2012; 157(1): 39-45.
- [3] Orth P, Kaul G, Cucchiari M, et al. Transplanted articular chondrocytes co-overexpressing IGF-I and FGF-2 stimulate cartilage repair in vivo. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2011;19(12):2119-2130.
- [4] Kanazawa I, Yamaguchi T, Sugimoto T. Serum insulin-like growth factor-I is negatively associated with serum adiponectin in type 2 diabetes mellitus. Growth Horm IGF Res. 2011;21(5):268-271.
- [5] Jansen M, Van Schaik FM, Richer AT, et al. Sequence of cDNA encoding human insulin-like growth factor I precursor. Nature. 1983;306(8):609-611.
- [6] Panek B, Gacko M, Palka J. Metalloproteinases, insulin-like growth factor-I and its binding proteins in aortic aneurysm. Int J Exp Pathol. 2004;85(3):159-164.

- [7] Ongaro A, Pellati A, Masieri FF, et al. Chondroprotective effects of pulsed electromagnetic fields on human cartilage explants. *Bioelectromagnetics*. 2011;32(7):543-551.
- [8] Hayes AJ, Ralphs JR. The response of foetal annulus fibrosus cells to growth factors: modulation of matrix synthesis by TGF- β 1 and IGF-1. *Histochem Cell Biol*. 2011;136(2):163-175.
- [9] Gallagher EJ, LeRoith D. Minireview: IGF, Insulin, and Cancer. *Endocrinology*. 2011;152(7):2546-2551.
- [10] Ng KW, O'Connor CJ, Kugler LE, et al. Transient supplementation of anabolic growth factors rapidly stimulates matrix synthesis in engineered cartilage. *Ann Biomed Eng*. 2011;39(10):2491-2500.
- [11] Chen Y, Ke J, Long X, Meng Q, et al. Insulin-like growth factor-1 boosts the developing process of condylar hyperplasia by stimulating chondrocytes proliferation. *Osteoarthritis Cartilage*. 2012;20(4):279-287.
- [12] Xue JX, Gong YY, Zhou GD, et al. Chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells induced by acellular cartilage sheets. *Biomaterials*. 2012;33(24):5832-5840.
- [13] Montagnani A, Gonnelli S, Alessandri M, et al. Osteoporosis and risk of fracture in patients with diabetes: an update. *Aging Clin Exp Res*. 2011;23(2):84-90.
- [14] Shi S, Mercer S, Eckert GJ, et al. Regulation of articular chondrocyte aggrecan and collagen gene expression by multiple growth factor gene transfer. *J Orthop Res*. 2012;30(7):1026-1031.
- [15] Rodrigues MT, Lee SJ, Gomes ME, et al. Bilayered constructs aimed at osteochondral strategies: The influence of medium supplements in the osteogenic and chondrogenic differentiation of amniotic fluid-derived stem cells. *Acta Biomater*. 2012;8(7):2795-2806.
- [16] Zhao R, Ren Y, Sun B, et al. Experimental study on chitosan mediated insulin-like growth factor gene transfection repairing injured articular cartilage in rabbits. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. 2010;24(11):1372-1375.
- [17] Thrailkill K, Quattrin T, Baker L, et al. Dual hormonal replacement therapy with insulin and recombinant human insulin-like growth factor(IGF)-1 in insulin-dependent diabetes mellitus: effects on the growth hormone/IGF/IGF-binding protein system. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82:1181-1187.
- [18] Thrailkill K, Quattrin T, Baker L, et al. Cotherapy with recombinant human insulin-like growth factor I and insulin improves glycemic control in type 1 diabetes. *RhIGF-I in IDDM Study Group*. *Diabetes Care*. 1999;22:585-592.
- [19] Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001;7: 211-217.
- [20] Evans CH, Robbins PD, Ghivizzani SC, et al. Clinical trial to assess the safety, feasibility and efficiency of transferring a potentially anti-arthritis cytokine gene to human joints with rheumatoid arthritis. *Hum Gene Ther*. 1996;7:1261-1264.