

人核糖核酸抑制因子基因在人脐血干细胞中的转染表达及对小鼠黑色素瘤基因治疗的研究

Transfection and Expression of hRI Gene on Human Umbilical Blood Stem Cells and Gene Therapy for Mouse Melanoma

邓燕杰¹, 张淑兰¹, 尚曦莹², 付攀峰², 崔秀云^{2*}

DENG Yan-Jie¹, ZHANG Shu-Lan¹, SHANG Xi-Ying², FU Pan-Feng² and CUI Xiu-Yun^{2*}

1. 中国医科大学附属第二医院妇产科, 沈阳 110004

2. 大连医科大学生化教研室, 大连 110027

1. Department of Obstetrics and Gynecology, Second Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China

2. Department of Biochemistry, Dalian Medical university, Dalian 116027, China

摘 要 探讨人核糖核酸抑制因子(hRI)基因在人脐血干细胞中的转染及表达情况,及转染后对小鼠 B16 黑色素瘤生长的影响。用免疫磁珠分离系统(MACS)分离纯化人脐血 CD34⁺ 细胞后,用制备的含 hRI 基因的逆转录病毒上清转染脐血 CD34⁺ 细胞,采用克隆形成法和 PCR 法检测转染效率,Western-blot 和免疫荧光法检测基因表达,同时观察 RI 对荷瘤 C57BL 小鼠 B16 黑色素瘤生长的影响。应用 MACS 能高度纯化人脐血 CD34⁺ 细胞,使分选后的脐血 CD34⁺ 细胞纯度平均达 96.15%。hRI 基因能够转染到脐血 CD34⁺ 细胞上,转染效率达 35%,Western-blot 和免疫荧光检测转染后 CD34⁺ 细胞 hRI 基因有阳性表达。经转 hRI CD34⁺ 细胞治疗,使小鼠 B16 黑色素瘤的生长速度减慢,成瘤率和瘤重降低,成瘤潜伏期延长。

关键词 人脐血 CD34⁺ 细胞, hRI 基因, 转染, 表达, 肿瘤

中图分类号 R730.3 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)01-0036-06

Abstract In order to explore the transfection and expression of hRI gene on human umbilical blood stem cells, and observe it's effect on the tumor growth. After enriching human umbilical cord blood CD34⁺ cells with a high-gradient magnetic cell sorting system (MACS), transfected them with supernatant of retrovirus containing human Ribonuclease inhibitor (hRI) cDNA. Hematopoietic progenitor clonogenic assay and PCR were used to evaluate transfection efficiency, and Western-blot and immune fluorescence were used to evaluate the expression quantity of hRI gene after transfection. Observe the effect of RI on the growth of melanoma in B16C57BL mice. The results showed that human umbilical blood CD34⁺ cells were highly purified by MACS, which made the purity of human umbilical blood CD34⁺ cells average 96.15%. hRI can be transfected on umbilical blood CD34⁺ cells, and the transfection efficiency was 35%. The positive expression of hRI gene on transfected CD34⁺ cells is identified by Western-blot and immune fluorescence assay. Mice injected with transfected CD34⁺ cells show a significant restraint of the tumor growth, a lower efficiency of tumor formation, a lower weight of the tumor and a longer incubation period of tumor for-

Received: May 9, 2004; Accepted: October 10, 2004.

This work was supported by Grant from: Liaoning Society's developing fund, Dalian Planing science project fund(No. 2001225002).

* Corresponding author. Tel: 86-0411-82927729; Email: yanjiedeng@yahoo.com.cn

辽宁省社会发展基金资助项目, 2002 大连市科技计划项目基金资助(No. 2001225002).

mation with respect to the control groups. The results demonstrated the capacity of RI to inhibited the tumor growth by blocking the vasculature in tumor.

Key words human umbilical blood CD34⁺ cells, hRI gene, transfection, expression, tumor

近年来,抑制肿瘤血管生成治疗肿瘤的研究,为解决肿瘤治疗开辟了新途径。至今为止,已有很多的血管阻断剂被发现。但由于没有高浓度、作用时间长的阻断剂及其复杂的提取过程影响了临床应用^[1,2]。基因治疗可以在一定程度上解决这个问题^[3]。人核糖核酸酶抑制因子(human Ribonuclease inhibitor, hRI)是广泛存在于哺乳动物细胞内的一种糖蛋白,其分子量为50kD,是RNA酶A的体内抑制剂,它可以保护RNA免受RNA酶A的降解,参与基因的表达与调控,是具有重要功能的一种蛋白质^[4]。血管生成因子(Angiogenin, Ang)是肿瘤细胞和正常细胞分泌的具有强烈的诱发血管生成活性的蛋白质^[5,6]。RI能与Ang紧密结合,阻断其作用。体外实验已经证实hRI基因能够抑制实体瘤的生长^[7]。脐血干细胞作为基因治疗的靶细胞,具有强的增殖潜能及易被逆转录病毒载体所转染的优势,倍受人们注目。我们以脐血CD34⁺细胞为靶细胞,应用逆转录病毒载体系统,将人核糖核酸酶抑制因子基因转移到人脐血干细胞中,使其在人脐血干细胞中得到高表达;进而静脉输注CD34⁺给经 γ 射线照射的小鼠,希望RI基因在小鼠体内长期表达,从而可以通过抑制肿瘤的血管形成这一途径抑制种植在小鼠皮下黑色素瘤的生长,为抗血管生成治疗肿瘤奠定基础。

1 材料与方法

1.1 重组逆转录病毒载体的制备

PLNCX- ψ 质粒由本室构建^[8],包装细胞系PA317由本室保存。

1.1.1 产毒细胞系的建立:PA317细胞在体积分数为10%胎牛血清(FBS)的DMEM培养基中,长至70%~80%汇片时用脂质体法将重组逆转录病毒载体(PLNCX- ψ)转染病毒包装细胞系PA317,用浓度为800 μ g/mL的G418筛选10d,得到抗G418阳性克隆产毒细胞。

1.1.2 病毒液制备:包装细胞系及产毒细胞系培养于体积分数为10%FBS的DMEM含G418 800 μ g/mL的培养基中,长至70%~80%汇片时全量换液,不加G418培养24h,收集上清,至-70℃,保存备用。使用前融化,0.45 μ m滤膜过滤。病毒滴度为1.5 \times

10⁵CFU/mL,同样情况下培养PA317并以PA317的上清作模拟转染。

1.2 脐血细胞的采集和分离

脐血采集于足月妊娠。剖宫产分娩的正常新生儿,断脐后胎盘娩出前采集,肝素抗凝。采集的样品4h内分选。

1.3 CD34⁺细胞分选

利用德国Miltenyi Biotec公司CD34单克隆抗体免疫磁珠分离系统(MACS)分离富集脐血中的CD34⁺造血干/祖细胞。分离方法按试剂盒说明书进行,流式细胞仪(flow cytometry)测其分选前后的纯度。标记抗体为荧光素异硫氰酸酯(FITC)标记的抗人CD34⁺的HPCA-2抗体,阴性对照为IgG1-FITC。分析软件为Elite4.02。

1.4 CD34⁺细胞体外扩增

体外扩增体系为含体积分数为15%FBS、15%马血清的DMEM培养液,浓度为2 \times 10⁴/mL CD34⁺细胞及各种组合的重组生长因子:50ng/mL rhscF(Pepro Tech EC 英国),50ng/mL rhIL-3(Pepro Tech EC 英国)50ng/mL rhIL-6(Pepro Tech EC 英国),将上述体系接种于6孔培养板中,每孔1mL,37℃、体积分数5%CO₂培养2周,每周换液并稀释细胞1次,计细胞总数及造血干/祖细胞集落形成数(CFCs),所设各种重组生长因子组合为:①IL-3+IL-6;②IL-3+SCF;③IL-6+SCF;④IL-6+IL-3+SCF;⑤无因子对照。

1.5 病毒转染

将分选的脐血CD34⁺细胞(5 \times 10⁴/mL)加入含有50ng/mL rhscF、50ng/mL rhIL-3、50ng/mL rhIL-6,体积分数为15%FBS、15%马血清的DMEM培养液中,预刺激培养12h后,重悬细胞于含2 μ g/mL的polybrene的病毒上清或模拟转染上清及细胞因子,并每12h补加一次病毒上清或模拟转染上清及细胞因子,共转染培养72h。

1.6 基因转移效率及表达的分析

1.6.1 基因转移效率的分析:将逆转录病毒或模拟转染后的CD34⁺细胞(5 \times 10⁴/mL)在含上述浓度细胞因子和500 μ g/mL G418的33%琼脂糖半固体培养基37℃、5%CO₂培养2周,倒置显微镜下观察,对

≥ 50 个细胞的集落进行计数,采用以下方法分析基因转染效率:① 基因转移效率 = G418 抗性集落数/未采用 G418 的总细胞集落数 $\times 100\%$;② 随机选择 G418 抗性单个集落,经扩大培养后,提取细胞基因组 DNA 进行 PCR 鉴定。以上述 DNA 为模板,以载体与 hRI 基因连接处序列为上游引物,以 hRI 基因内部一序列为下游引物,在 $50\mu\text{L}$ 反应体系中进行 PCR 扩增。PCR 反应条件为: 95°C 预变性 5min, 95°C 变性 30s, 55°C 退火 1min, 72°C 延伸 90s, 扩增 30 个循环, 72°C 延伸 10min。反应产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳分析。随机选择 G418 抗性单个集落行 Giemsa 染色,观察细胞活性。

1.6.2 采用 Western-blotting 法检测转染 hRI 基因的蛋白表达:用 Trizol 液从 CD34⁺ 细胞中提取蛋白,储存在 -20°C ,取 $20\mu\text{g}$ 蛋白放入每个槽中,用 12% SDS-PAGE 溶解并转到硝酸纤维素膜 (NC 膜),用 30g/L BSA 封闭 PBS 液中 4°C 过夜。封闭后 NC 膜与一抗反应 (兔抗 hRI IgG) (1:200) 37°C 1h,用 TTBS 彻底冲洗 10min 3 次,NC 膜与辣根过氧化物酶标记的二抗结合, (IgG-AP 包被的抗兔二抗) (1:500) 37°C 孵育 1h,将 NC 膜浸于 DAB 显色液中,观察有清晰的特异条带出现时,用大量的水冲洗 NC 膜以终止显色反应。

1.6.3 免疫荧光法检测转染 hRI 基因的表达:体外培养的 CD34⁺ 细胞用 PBS 清洗后,将细胞涂于玻片上,待细胞干燥后,迅速用予冷的 80% 丙酮固定 10min,空气干燥 10min,用 PBS 清洗 2min,将 0.5% TritonX-100 滴加在玻片上, 37°C 孵育标本 2 次,每次 5min,于封闭液中 37°C 孵育标本 20min,将一抗用抗体稀释液稀释 (1:300) 倍,滴加在玻片上, 37°C 孵育 1h。用封闭液清洗玻片 3 次,每次 5min,将二抗用抗体稀释液稀释 (1:100),滴加在玻片上, 37°C 孵育 30min,用 PBS 清洗玻片 3 次,每次 5min,快速在荧光显微镜下观察。

1.7 RI 对荷瘤 C57BL 小鼠 B16 黑色素瘤生长的影响

1.7.1 取 40 只雄性 20g 左右的 C57BL 纯系小鼠,在接受 CD34⁺ 细胞前 1 天进行 γ 射线照射。每只小鼠接受 8Gry 剂量的照射,照射强度为 0.716cGry/s ,校正因子为 1.1。具体方法是:小鼠先接受 4Gry 的照射,即以 0.716cGry/s 的强度照射 508s,然后调整小鼠的体位再接受 4Gry 的照射。所用放射源为 Co-60。

1.7.2 将小鼠分成 4 组,即未接受静脉输注 CD34⁺

组、静脉输注 CD34⁺ 组、静脉输注转空质粒 CD34⁺ 组、静脉输注转 RICD34⁺ 组,每组 10 只,于无菌间饲养,食物及水均经严格消毒处理。

1.7.3 照射后的第二天,将上述转染后的 CD34⁺ 细胞按 1×10^6 通过静脉输注给小鼠。小鼠腹腔内注射 IL-3, $6\mu\text{g}/\text{次}/\text{只}$,每周 2 次, SCF, $6\mu\text{g}/\text{次}/\text{只}$,每周 2 次, IL-6, $6\mu\text{g}/\text{次}/\text{只}$,每周 2 次, rhEPO, 20unit/只,每周 3 次。

1.7.4 小鼠接受静脉输注 CD34⁺ 细胞 7d 后,将 5×10^5 黑色素瘤 B16 细胞接种于小鼠右腋下。每天观察动物致肿瘤率和成瘤时间,称量记录小鼠体重。

1.7.5 肿瘤长到 4 周后,大约 1~3g 左右,将肿瘤全部取出,称重记录;然后用福尔马林固定。

1.7.6 瘤组织做病理切片,用免疫组化检测血管内因子,观察血管密度。

2 结果

2.1 脐血 CD34⁺ 细胞的分选、纯化

CD34⁺ 单克隆抗体免疫磁珠分离系统 (MACS) 分选前 CD34⁺ 细胞纯度为 2.7%~3.8%;分选后一次过柱可达 64.88%,两次过柱可达 96.15%,回收率为 71.2% (见图 1)。

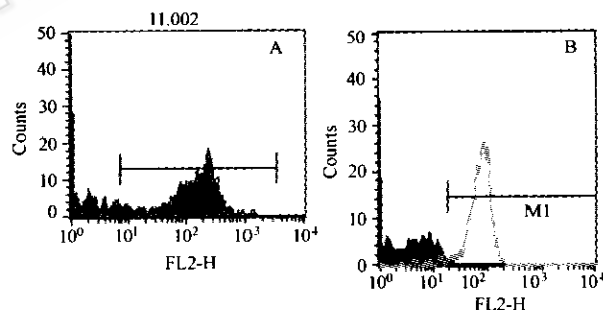


图 1 流式细胞仪鉴定用 MACS 分选的脐血 CD34⁺ 细胞的纯度

Fig. 1 Detection of separation and purification of Cord blood CD34⁺ by flow cytometry

A: the purity of Cord blood CD34⁺ is 64.88% after first column; B: the purity of Cord blood CD34⁺ is 96.15% after second column.

2.2 脐血 CD34⁺ 细胞的体外扩增

为探讨不同细胞因子对脐血干/祖细胞体外培养的扩增效应,以期优化干/祖细胞体外培养扩增条件及提高转染效率,应用 CD34⁺ 单抗免疫磁珠分选 5 例脐血后,用 4 组不同组合的细胞因子培养扩增干/祖细胞。结果显示:无任何细胞因子存在时细胞扩增效率和转染效率明显低于其他 4 组; IL-3 + SCF 的组合、IL-3 + IL-6 的组合, IL-6 + SCF 的组合转染效

率明显提高,分别为 25.5%,19.6% 和 18.7%;IL-3 + IL-6 + SCF 三种因子联合应用效果更佳,转染率提高到 35%,明显高于其他 4 组,同时扩增效率也明显高于其他 4 组。(见图 2)

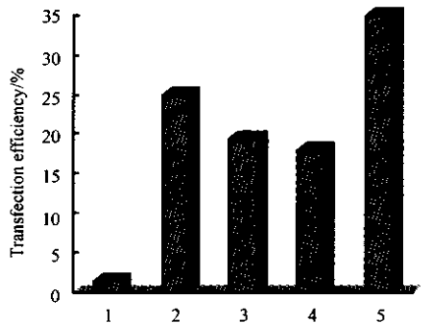


图 2 各种细胞因子组合的转染效率的比较

Fig.2 The effects of various cytokins on the transfection

1: no cytokines added; 2: IL-3 and SCF;
3: IL-3 and IL-6; 4: IL-6 and SCF;
5: IL-3, IL-6 and SCF.

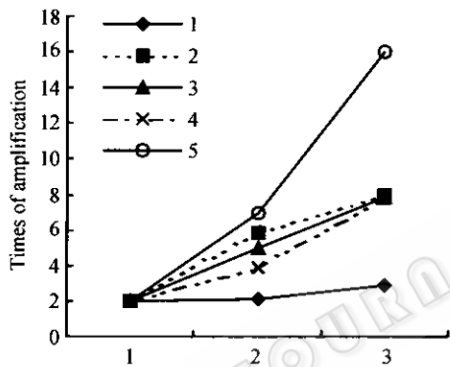


图 3 各种细胞因子的组合对细胞扩增的影响的比较

Fig.3 The effects of various cytokins on the cell amplification

1: no cytokines added; 2: IL-3 and SCF;
3: IL-3 and IL-6; 4: IL-6 and SCF;
5: IL-3, IL-6 and SCF.

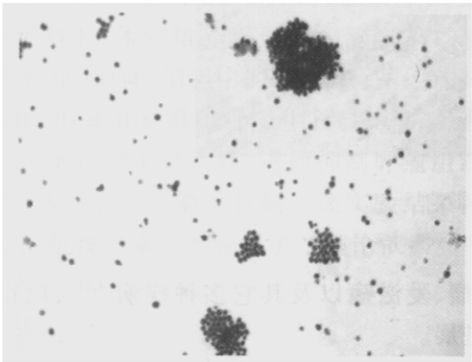


图 4 Giemsa 染色 CD34⁺ 细胞克隆

Fig.4 Clones of CD34⁺ cell by Giemsa staning

Concentration is 500μg/mL after screening with G418 and Giemsa stain then magnify 20 times by lightmicroscopy and photograph.

2.3 CD34⁺ 细胞基因转染效率

2.3.1 集落形成法:模拟转染细胞在选择性培养基中无克隆形成,在非选择培养基中形成 186 个克隆;逆转录病毒转染的 CD34⁺ 细胞在选择性培养基中形成 56 个克隆,而在非选择培养基中形成 170 个克隆,因此集落法测转染效率为 32.9%。Giemsa 染色 CD34⁺ 细胞克隆(见图 4)。

2.3.2 PCR 法检测 CD34⁺ 细胞集落中的 hRI 基因(见图 5)。

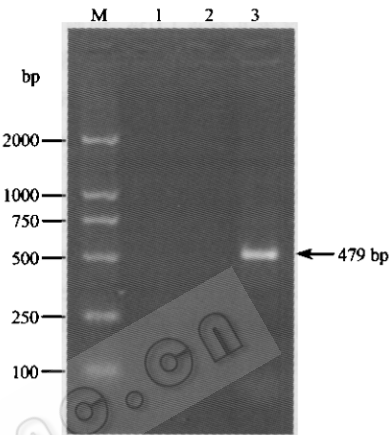


图 5 PCR 法检测 CD34⁺ 细胞集落中的 hRI 基因

Fig.5 PCR analysis for hRI gene integration into mouse hemotopoietic cell chromosome.

M:marker 2000; 1. no iv; 2. iv CD34⁺ cell; 3. iv CD34⁺ PLNCX-RI cell.

2.4 Western-blot 或免疫荧光检测转染后 hRI 基因的表达

Western-blot 检测到 hRI 基因的表达(见图 6)。将转染后体外培养的 CD34⁺ 细胞涂于玻片上,固定后分别与一抗、二抗反应,荧光显微镜下观察,可见细胞克隆呈现阳性荧光(见图 7)。



图 6 Western-blotting 鉴定不同实验组的 hRI 基因的表达

Fig.6 Western blotting for hRI in the different groups

B: control A, C, D: hRICD34⁺ cell.

2.5 肿瘤的生长情况

结果表明,没有接受静脉输注 CD34⁺ 小鼠、接受静脉输注未转染 CD34⁺ 小鼠、接受静脉输注转空质粒 CD34⁺ 细胞小鼠肿瘤生长的速度与接受静脉输注转 RI CD34⁺ 细胞小鼠肿瘤生长的速度比较,前三组肿瘤生长快,而后者生长慢;且后者成瘤潜伏期延长,成瘤率和瘤重降低。说明经转 RI CD34⁺ 细胞治疗,使黑色素瘤的生长速度减慢,成瘤率和瘤重降

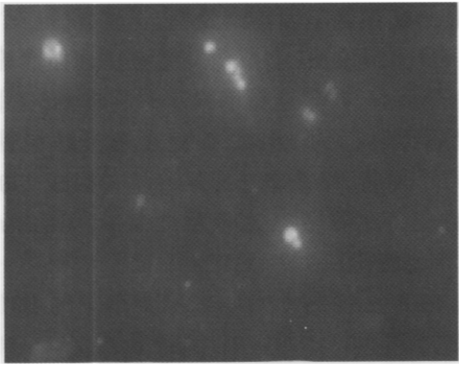


图 7 免疫荧光鉴定 CD34⁺ 细胞克隆, 呈现荧光(黄色)为阳性克隆

Fig.7 Detection of the expression of hRI by immunofluorescent in CD34⁺ cells Positive CD34⁺ cells are yellow

低,成瘤潜伏期延长(见表 8 和 Fig.9)。

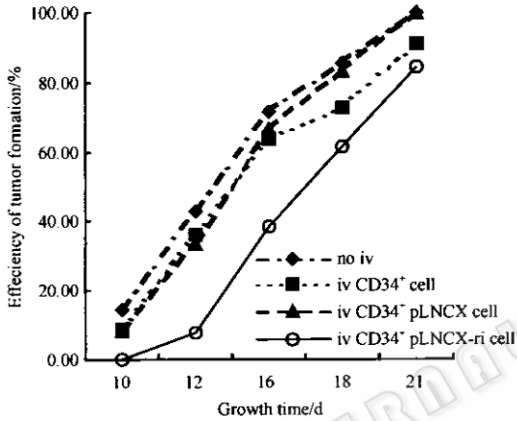


图 8 RI 对各组肿瘤生长的影响

Fig.8 The effect of RI on tumorigenesis efficiency at different

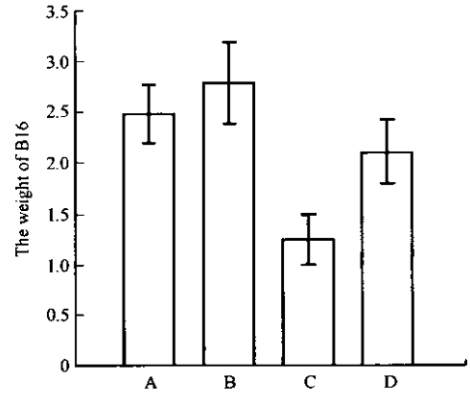


图 9 RI 对瘤重的影响

Fig.9 The effect of RI on the weight of B16

A:iv CD34⁺ pLNCX cell; B: no iv; C: iv CD34⁺ pLNCX-ri cell; D: iv CD34⁺ cell.

组织学的结果显示,经 RI 基因治疗后,RI 可以明显抑制黑色素瘤血管生成,瘤组织血管密度降低。未接受静脉输注 CD34⁺ 组、静脉输注 CD34⁺ 组、静脉输注转空质粒 CD34⁺ 组计数 10 个视野(40 × 10 倍)的血管数分别为 91 ± 7.2、87 ± 6.9、96 ± 8.7,静脉输注转 RICD34⁺ 组为 35 ± 2.8(见 Fig. 10)。转染组的血管数明显减少。

3 讨论

自脐血中发现造血干细胞以来,脐血干细胞移植已成为国内外学者研究的热点,因为脐血干细胞具有无法比拟的优势和诱人的应用前景。脐血来源

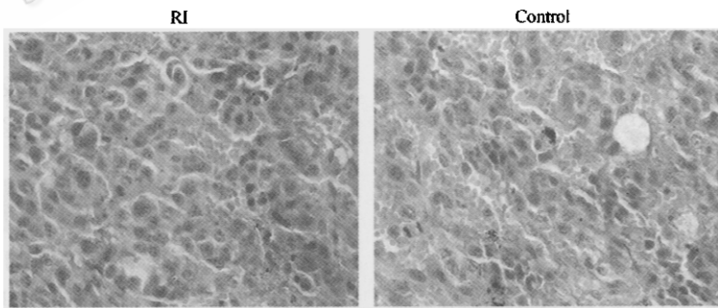


图 10 RI 对血管密度的影响

Fig.10 The effect of RI on blood vessels

丰富,容易采集,脐血中造血干/祖细胞含量丰富,增殖力强,在适宜细胞因子的作用下可以大量扩增,适于做基因治疗的靶细胞。将与治疗疾病相关的基因导入脐血干细胞,使其在特定终末细胞中长期稳定表达,从而达到治疗某些疾病的目的。近年来,已使用脐血干细胞开展基因转移和基因治疗遗传性疾

病、肿瘤、爱滋病以及其它多种疾病^[9,11],取得了可喜的进展。

我们对不同组合的造血因子对脐血 CD34⁺ 细胞的转染率及体外扩增效应进行了比较。研究结果显示:IL-3 + IL-6 + SCF 三种因子联合应用效果更佳,转染率提高到 35%,明显高于其他 4 组,同时扩

增效率也明显高于其他4组。目前对于细胞因子促进基因转染的最佳组合尚无定论,大量实验证实 IL-3, IL-6, SCF 三种细胞因子可增加逆转录病毒的感染^[10], 逆转录病毒转染效率的提高与造血干细胞增殖的增加呈正相关;我们实验结果与其相似。

核糖核酸酶抑制因子是 RNase A 的抑制剂,同时也与血管生长因子(Angiogenin, Ang)结合,而且与后者有更大的亲和力($k_i = 7.1 \times 10^{-16} \text{ mol/L}$)。Ang 是 RNase A 超家族的成员之一。它除了具有 RNase A 的活性外,还具有促进血管形成的活性。Ang 是第一个纯化的促血管形成因子,已对其进行了氨基酸序列分析和基因测序。Ang 作用于血管内皮细胞,促进血管内皮细胞的增殖,具有强烈的促进新血管形成的活性。其在组织和细胞中的分布十分广泛。培养的结肠癌细胞、肝癌细胞中可检测到 Ang。在胃腺癌、结肠腺癌、乳腺癌、子宫内膜癌组织中都有表达。序列分析、结构分析和酶促反应动力学表明 RI 与 Ang 能够紧密结合,形成接触广泛、结合牢固的复合物。RI 与 Ang 结合后可以抑制其促进血管生成的活性。人 RI 能抑制某些鼠实体瘤的生长^[12]。本实验也已经证实 RI 能抑制荷瘤 C57BL 小鼠 B16 黑色素瘤生长。本实验为了保证在静脉输注期间 CD34⁺ 在小鼠体内存活并增殖,几种细胞因子被定期使用^[13]。输注前 γ 射线照射小鼠,目的是破坏小鼠自身的骨髓造血系统,使小鼠骨髓有足够的空间留给移植的造血细胞生长。输注的 CD34⁺, 一方面,它本身能够选择性分布在肿瘤组织周围,参与肿瘤基质形成,抑制肿瘤生长;另一方面,CD34⁺ 携带的 RI 基因表达后可能与 Ang 结合抑制肿瘤血管生成,从而抑制肿瘤生长。

本实验结果表明 hRI 基因可以转染到人脐血 CD34⁺ 细胞上;体外培养后可检测到转染的 hRI 基因在人脐血 CD34⁺ 细胞中的表达,RI 基因能抑制荷瘤 C57BL 小鼠 B16 黑色素瘤生长。RI 基因通过抑制 Ang 的促血管生成活性,进而抑制肿瘤组织的血管生成,达到治疗肿瘤的目的。该实验结果为妇科实体瘤的抗血管基因治疗提供了理论依据。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Crystal RG. The body as a manufacturer of endostatin. *Nat Biotechnol*, 1999, **17**:336-337
- [2] Tomlinson E. Impact of the new biologics on the medical and pharmaceutical sciences. *J Pharm Pharmacol*, 1992, **44**:147-159
- [3] Drixler TA, Rinkes IH, Ritchie ED *et al*. Continuous administration of angistatin inhibits accelerated growth of colorectal liver metastases after partial hepatectomy. *Cancer Res*, 2000, **60**:1761-1765
- [4] Sharp R. Cytoplasmic Ribonuclease Inhibitor. In: Abelson JN, Simon MI. Eds. *Methods in Enzymology*. San Diego: Academic Press, 2001
- [5] Papageorgiou AC, Shapiro R, Acharya KR. Molecular recognition of human angiogenin by placental ribonuclease inhibitor. *EMBO J*, 1997, **16**(17): 5162-5177
- [6] Rybak SM, Sanovich E, Hollingshead MG *et al*. "Vasocrine" Formation of Tumor Cell-lined Vascular Spaces: Implications for Rational Design of Antiangiogenic Therapies. *Cancer Res*, 2003, **63**(11): 2812-2819
- [7] Polakowski IJ, Lewis MK, Muthukkaruppan VR, *et al*. A ribonuclease inhibitor expression anti-angiogenic properties and leads to reduced tumor growth in mice. *Am J Pathol*, 1993, **143**(2): 507-517
- [8] Tian YX, Yu XP, Wang DM *et al*. The construction of eukaryotic expressive vector of RI gene and the effects of the transfected pLNCX-ri on the growth of C6 glioma cells. *China Oncology*, 2001, **11**(6): 481-484
- [9] Jin CH, Kusuhara K, Yonemitsu Y *et al*. Recombinant Sendai virus provides a highly efficient gene transfer into human cord blood-derived hematopoietic stem cells. *Gene Therapy*, 2003, **10**(3): 272-277
- [10] Correll PH, Colilla S, Dave HP *et al*. High levels of human glucocerebrosidase activity in macrophages of long term reconstituted mice after retroviral infection of hematopoietic stem cells. *Blood*, 1992, **80**:331-336
- [11] Sanz E, Alvarez Mon M *et al*. Human cord blood CD34⁺ Pax-5⁺ B-cell progenitors: single-cell analyses of their gene expression profiles. *Blood*, 2003, **101**(9): 3424-3430
- [12] Yu XP(于秀萍), Cui XY(崔秀云), Gao Y(高颖) *et al*. The inhibition of ribonuclease inhibitor on the growth of malignant tumor. *Tumor(肿瘤)*, 1996, **16**(1):33
- [13] Takashi Yokoo, Yoya Ohashi, Yasunori Utsunomiya *et al*. Gene delivery using human cord blood derived CD34⁺ cells into inflamed glomeruli in NOD/SCID mice. *Kidney International*, 2003, **64**: 102-109