

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.14.001

## 慢病毒载体介导 CGRP 基因体外转染及对 MSC 生物学特性的影响\*

陈攀科, 石 蓓<sup>△</sup>, 许官学, 刘志江, 龙仙萍, 张 巍, 马 帅

(遵义医学院附属医院心血管内科, 贵州遵义 563000)

**[摘要]** **目的** 探讨慢病毒载体介导降钙素基因相关肽(CGRP)基因体外转染间充质干细胞(MSC)及其对 MSC 生物学特性的影响。**方法** 大鼠 MSC 进行分离、培养及鉴定。CGRP 重组慢病毒转染 MSC 后,采用荧光显微镜和流式细胞技术测定其转染率。实时定量 PCR、免疫荧光细胞化学及 ELISA 法检测 MSC 中 CGRP 的表达。慢病毒转染后通过 MTT、 $\beta$ -半乳糖苷酶染色和诱导分化评价 MSC 的增殖、衰老及分化能力。**结果** 慢病毒载体介导 CGRP 基因转染 MSC 后 48 h 可稳定表达, MOI=30 时,转染率达 80% 以上。与 MSC 组和空载病毒转染(MSC-EGFP 组)比较, CGRP 修饰的 MSC(MSC-CGRP 组)中 CGRP 的 mRNA 和蛋白表达水平增高(均  $P < 0.01$ )。MTT、 $\beta$ -半乳糖苷酶染色和诱导分化结果显示,病毒转染后对 MSC 增殖、衰老及向内皮分化基本没有影响。**结论** MSC 是一种理想的基因载体细胞,可作为 CGRP 基因转染的靶细胞用于基因治疗,为后续体内、体外实验奠定基础。

**[关键词]** 降钙素基因相关肽;转染;间充质干细胞;生物学特性

**[中图分类号]** R543.4

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2015)14-1873-03

## Lentiviral vector mediated CGRP gene in vitro transfection and its effects on biological properties of MSC\*

Chen Panke, Shi Bei<sup>△</sup>, Xu Guanxue, Liu Zhijiang, Long Xianping, Zhang Wei, Ma Shuai

(Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563000, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore in vitro mesenchymal stem cell (MSC) transfection of lentiviral vector mediated calcitonin gene-related peptide(CGRP) gene and its effects on biological properties of MSC. **Methods** MSC were isolated, cultured and identified. MSC were infected by lentivirus encoding recombinant enhanced green fluorescent protein (EGFP) gene and CGRP (Lv-EGFP-CGRP). The transfection efficiency was determined by the inverted fluorescence microscope and flow cytometry. The expression levels of CGRP were detected in CGRP-modified MSC by using real-time PCR, immunocytochemistry and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The proliferation, aging and differentiation ability of MSC were evaluated by MTT,  $\beta$ -galactosidase staining and inducing differentiation respectively. **Results** After 48 h of MSC transfection by Lv-EGFP-CGRP, EGFP/CGRP could be expressed stably. When multiplicity of infection (MOI) was 30, the transfection efficiency reached more than 80%. Compared with the MSC group and the MSC-EGFP group, the mRNA and protein expression levels of CGRP in CGRP-modified MSC(MSC-CGRP group) were markedly increased(all  $P < 0.01$ ). The results of MTT,  $\beta$ -galactosidase staining and inducing differentiation assay demonstrated that the transfected CGRP basically had no effect on the proliferation, aging and endotheliocyte differentiation of MSC. **Conclusion** MSC is a kind of ideal genetic vector cell, which can serve as the target cell of CGRP gene transduction for the application of gene therapy and lays the foundation for follow-up in vitro and vivo experiments.

**[Key words]** calcitonin gene-related peptide; transfection; mesenchymal stem cells; biological property

本研究小组前期的研究显示,骨髓间充质干细胞(MSC)移植能在一定程度上促进损伤动脉内皮的修复,但其对血管平滑肌细胞(VSMC)的影响较小<sup>[1-2]</sup>。降钙素基因相关肽(CGRP)具有抑制 VSMC 增殖的作用,但 CGRP 在外周血的半衰期很短,需要通过合适的载体和靶细胞将其带入体内来持续发挥作用<sup>[3]</sup>。因此,本研究旨在研讨慢病毒载体介导 CGRP 基因体外转染 MSC 后, CGRP 的表达及对 MSC 生物学特性的影响,为进一步在细胞和动物模型中的研究奠定基础。

## 1 材料与方法

**1.1 主要试剂与材料** 雄性 SD 大鼠购自重庆第三军医大学动物实验中心。慢病毒载体 Lv-EGFP 和 Lv-CGRP 由上海英为信公司提供; CGRP 引物由上海英为信公司合成。所用的抗体均购自美国 Abcam 公司。ELISA 试剂盒购自美国 Biosci-

ences 公司。MTT 购自美国 Promega 公司。细胞衰老特异性检测试剂盒购自上海杰美基因有限公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 MSC 的培养和鉴定** SD 大鼠(100 g 左右)脱臼处死后,无菌条件下获取骨髓,离心纯化并获取 MSC。MSC 在 10% 胎牛血清的完全培养基中培养,每 2~3 天换液,弃悬浮细胞,细胞铺满瓶底约 90% 后传代,第 2~4 代细胞用于实验;取第 3 代细胞通过流式细胞术检测 MSC 表面标记物(CD29 和 CD45)来鉴定,分别加入各自 IgG 作为对照。

**1.2.2 MSC 基因修饰和转染** 空载病毒转染 MSC 设为 MSC-EGFP, CGRP 重组慢病毒转染设为 MSC-CGRP。荧光显微镜初步评估转染效率和最佳感染复数,进而用流式细胞术进一步证实。

\* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81060014)。 作者简介:陈攀科(1982-),硕士,主治医师,主要从事血管及冠心病介入研究。

△ 通讯作者, E-mail: Shibeiz147@163.com。

**1.2.3 实时定量 PCR 检测** 检测上述最佳感染复数下 MSC 中 CGRP 的 mRNA 表达水平。按 RNA 抽提试剂盒操作说明,提取每一克隆的总 RNA。通过逆转录酶行逆转录和按 SYBR Green 混合试剂盒说明书进行 cDNA 扩增。CGRP 基因用特殊的低聚核苷酸引物,并以大鼠 18S-QP 基因作为内参对照。PCR 引物序列如下,CGRP:5'-AGC CCC AGA TCT AAG CGG TGT G-3' and 5'-TCC TTG GCC ATA TCC CTT TTC TTG-3';18S:5'-AAA CGG CTA CCA CAT CCA AG-3' and 5'-CCT CCA ATG GAT CCT CGT TA-3'。数据通过 Ct 比较法进行分析、定量( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )。

**1.2.4 免疫荧光细胞化学 (ICC) 法** 通过 ICC 法检测上述最佳感染复数下 MSC 中 CGRP 蛋白的表达。细胞爬片,多聚甲醛固定,0.3% Triton 破膜,山羊血清封闭,兔抗大鼠 CGRP 一抗 4℃ 孵育过夜,用 1:100 驴抗兔 IgG-TRITC 二抗 37℃ 孵育 1 h,然后 DAPI 复染细胞核 3~5 min,抗荧光淬灭剂封,激光共聚焦显微镜 (LSCM) 下拍照并定性分析。

**1.2.5 ELISA** 通过 ELISA 试剂盒检测被转染 MSC 上清中 CGRP 蛋白水平。取 P3 MSC 细胞按  $(0.5 \sim 1.0) \times 10^6$  个/孔的细胞密度接种于 6 孔板中,CGRP 重组慢病毒按上述最佳转染复数转染 MSC 48 h 后,继续培养 48 h,收集上清液,然后根据 ELISA 试剂盒说明书方法检测上清液中 CGRP 的蛋白水平 ( $n=3$ )。

**1.2.6 MTT 检测** 实验分 MSC-CGRP 组、MSC-EGFP 组和对照组 (MSC 组)。取 P3 MSC 按  $(0.5 \sim 1.0) \times 10^4$  个/孔接种于 96 孔板中,细胞贴壁后按 MOI=30 进行病毒转染,每天各取 3 组 (每组 6 孔) 行 MTT 检测,通过紫外分光光度计 (波长 490 nm) 进行比色,测定光密度 (OD) 值。

**1.2.7  $\beta$ -半乳糖苷酶检测法** 分组同上,病毒转染后均按正常细胞培养,传至 P5,将  $(1.0 \sim 2.0) \times 10^3$  个/孔细胞接种于 6 孔板中 (即接种细胞为 P6),培养 48 h 后,按试剂盒操作说明书进行染色。镜下观察衰老细胞 (蓝染细胞) 并根据公式 [蓝染率 = 染色阳性细胞 / 总细胞数  $\times 100\%$  (每孔观察 3 个视野,  $n=3$ )] 计算衰老率。

**1.2.8 病毒转染对诱导分化的影响** 分组同上,病毒转染后予培养基 (含血管内皮生长因子 10 ng/mL、成纤维细胞生长因子  $\beta$  5 ng/mL) 连续培养 14 d,收集细胞分别行流式细胞术检测 CD29、CD31 的表达。

**1.3 统计学处理** 应用 SPSS17.0 软件进行统计学分析。计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间采用单因素方差分析或  $t$  检验检测组间的差异。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 MSC 的形态及表型特征** 原代细胞培养至第 4 天可见小集落形成,并相互互联,7 d 左右满瓶底,形态呈长梭型,漩涡状排列,每 3~4 天传代 1 次,传至第 5 代细胞形态未见明显改变 (图 1A);流式细胞术检测第 3 代 MSC 表面标记,结果显

示,CD29 达 98.05%,而 CD45 为 3.74% (图 1B),符合 MSC 的生物学特征。

**2.2 CGRP 基因体外转染 MSC 的效率** 慢病毒载体介导 (MOI=30) 转染 MSC 后,通过明暗视野对比,转染率达 80% 以上 (图 2A),流式细胞术证实转染率为 83.16% (图 2B)。

**2.3 CGRP 修饰 MSC 中 CGRP 的表达** 实时定量 PCR 检测 CGRP 修饰 MSC 后 CGRP 的 mRNA 表达水平,结果显示,与 MSC 组 ( $1.00 \pm 0.12$ )、MSC-EGFP 组 ( $1.12 \pm 0.24$ ) 相比, MSC-CGRP 组 ( $9.85 \pm 0.28$ ) 表达明显增加,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。ICC 法检测 MSC 中 CGRP 蛋白的表达,结果显示,CGRP 修饰 MSC 中可见 CGRP 阳性表达,且表达部位位于细胞胞质中 (图 3)。ELISA 检测其蛋白分泌水平,结果显示,培养 48 h 后与 MSC 组和 MSC-EGFP 组的上清液中几乎无 CGRP 表达,而 MSC-CGRP 组中水平为 25.30 pg CGRP/ $5 \times 10^5$  个细胞/mL,与前两组相比,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。

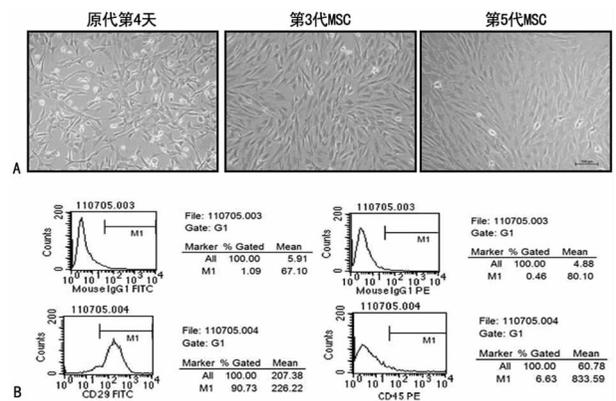


图 1 MSC 形态和表型特征

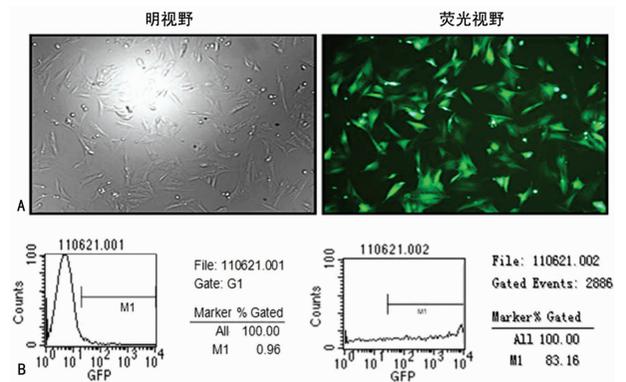


图 2 CGRP 重组慢病毒在 MSC 中的转染效率

表 1 MTT 检测结果 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d
MSC	6	0.52±0.02	0.64±0.05	0.82±0.04	1.27±0.09	1.59±0.07	1.83±0.11
MSC-EGFP	6	0.49±0.03	0.56±0.03	0.78±0.03	1.23±0.09	1.54±0.12	1.81±0.09
MSC-CGRP	6	0.52±0.02 <sup>a</sup>	0.61±0.02 <sup>a</sup>	0.72±0.05 <sup>a</sup>	1.31±0.08 <sup>a</sup>	1.63±0.05 <sup>a</sup>	1.89±0.15 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>:  $P > 0.05$ , 与 MSC 组和 MSC-EGFP 组比较。

**2.4 慢病毒载体转染对 MSC 增殖的影响** 通过 MTT 法检测 MSC 组、MSC-EGFP 组和 MSC-CGRP 组中 VSMC 的 OD 值,连续观察 6 d,结果显示,在同一时间点,各组间相比差异无统计学意义( $P>0.05$ )。见表 1。

**2.5 慢病毒载体转染对 MSC 衰老的影响** 通过  $\beta$ -半乳糖苷酶染色检测各组细胞的衰老率,按公式计算各组衰老率, MSC 组[(32.83±4.91)%]、MSC-EGFP 组[(34.67±6.31)%]及 MSC-CGRP 组[(31.67±4.97)%]组间比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

**2.6 慢病毒载体转染对 MSC 分化的影响** 通过流式细胞术检测 CD31 的表达来判断各组 MSC 向内皮分化的能力,结果显示,转染 CGRP 对 MSC 向内皮分化没有影响。见图 4。

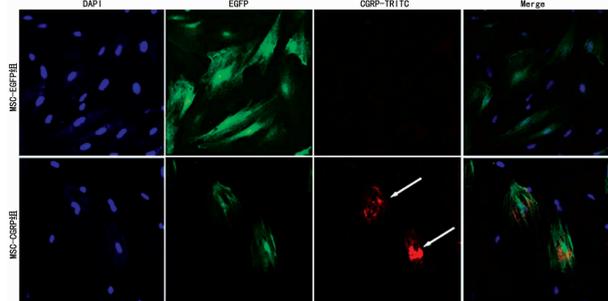


图 3 ICC 法检测 CGRP 修饰 MSC 后 CGRP 的蛋白表达

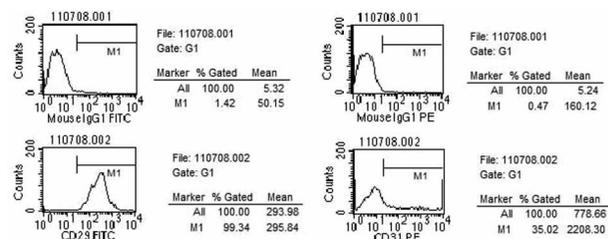


图 4 流式细胞术检测 CGRP 修饰的 MSC 向内皮诱导分化结果

### 3 讨论

近来研究显示, MSC 移植治疗心血管疾病是目前基础和临床研究的热点[4-5]。MSC 不仅具有不断自我更新、多向分化潜能,还具有免疫耐受性,并且易于外源基因的转染和表达而其多功能性不受影响等特点[6]。目前已有研究表明,体外培养的 MSC 可向心肌和血管内皮等细胞分化,使其广泛用于基础研究中的新生血管化和促进血管生成[7-8];同时,在损伤心脏模型中移植 MSC,发现能促进心功能的恢复和血管生成,使其可能成为心血管修复的理想细胞群[9]。本研究小组先前的研究结果也显示, MSC 体内移植在一定程度上能促进损伤动脉内皮的修复,从而抑制新生内膜的形成、减轻术后血管内狭窄的程度,但其对 VSMC 的影响相对较小[1-2]。

CGRP 是神经肽家族的一种的血管活性肽,广泛分布于神经及心血管系统,主要由感觉神经合成与分泌,具有多种生理功能,参与各种生理、病理过程,包括抑制炎症、细胞增殖等,是目前体内最强的内源性扩血管肽之一[10]。在心血管系统, CGRP 具有多种生物活性,如强大的扩血管作用、抑制 VSMC 增殖、保护内皮细胞,以及参与血管新生等作用[11-12]。但 CGRP 在外周血的半衰期很短,直接注入体内是很难持续发挥作用的,故需要通过合适的载体和靶细胞将其带入体内来发挥

作用。对此,本研究旨在研讨慢病毒载体介导 CGRP 基因体外转染 MSC 后, CGRP 的表达及对 MSC 生物学特性的影响。

本实验首先通过荧光显微镜和流式细胞技术证实,慢病毒载体介导 CGRP 能成功转染 MSC,且当 MOI 为 30 时转染率达 80% 以上。那么被慢病毒载体成功转染的 MSC 是否表达 CGRP 呢? 为了回答上述问题,本实验从 mRNA 水平和蛋白水平两个方面进行验证。mRNA 水平上,实时定量 PCR 检测结果显示, MSC 自身即有少量 CGRP 的表达,且病毒转染对其无明显影响,而慢病毒载体介导 CGRP 基因转染后的 MSC,其 CGRP 表达量通过  $2^{-\Delta\Delta CT}$  计算后[13],是 MSC-EGFP 组和 MSC 组的 9.85 倍( $P<0.01$ )。在蛋白水平上,通过多重 ICC 法结果发现,与 MSC 组和 MSC-EGFP 组相比, MSC-CGRP 组中存在 CGRP 蛋白的表达,其表达部位位于细胞质;进而 ELISA 检测结果证实, CGRP 修饰的 MSC 能分泌 CGRP,其水平为 25.30 pg CGRP/ $5\times 10^5$  个细胞/mL,与 MSC 组和 MSC-EGFP 组相比,差异有统计学意义( $P<0.01$ )。由此说明 CGRP 修饰的 MSC 中高表达 CGRP 且能分泌 CGRP 蛋白。但病毒转染是否对 MSC 的生物学特性有影响呢?

对此,本实验使用 MTT 和  $\beta$  半乳糖苷酶染色法测定各组 MSC 的存活率,以 MSC 组为对照,结果发现 MSC-EGFP 组和 MSC-CGRP 组两组细胞增殖和衰老水平均无明显差异,说明转染 CGRP 基因后的 MSC 仍具有其基本的生物活性,细胞存活率及生长未受到抑制。虽然既往有文献报道,外源性 CGRP 对 MSC 增殖有促进作用,且能促进 MSC 的 DNA 合成和有丝分裂,但本实验通过 MTT 法连续观察 6 d 并未发现转染 CGRP 基因组的 MSCs 增殖能力有所增加,这可能与 CGRP 基因通过慢病毒已整合到 MSC 中,并成为其中一部分的有关[14]。对 CGRP 基因修饰的 MSC 予血管内皮生长因子、成纤维细胞生长因子  $\beta$  诱导分化后发现, CD31 的表达较对照明显升高, CD31 为内皮细胞的特异性标志,这说明转染后的 MSC 仍具有向内皮分化的能力。

综上所述,慢病毒载体介导 CGRP 基因能成功转染 MSC,转染的 MSC 稳定高表达 CGRP 且能分泌 CGRP 蛋白;转染对 MSC 增殖、分化等生物学特性无明显影响。由此可知, MSC 是一种理想的基因载体细胞,为 CGRP 基因转染 MSC 后续的体内、体外实验奠定了基础。

### 参考文献

- [1] 石蓓,郭艳,王正龙,等. 缺氧预处理外周间充质干细胞对兔血管成形术后再狭窄的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2009,25(9):1686-1691.
- [2] 石蓓,赵然尊,许官学,等. 重组人粒细胞集落刺激因子对兔颈动脉粥样硬化球囊损伤后再内皮化和内膜增生的影响[J]. 中华心血管病杂志, 2009,37(5):441-444.
- [3] 王钊,金丹,陀永华,等. 降钙素基因相关肽促进大鼠 BM-SCs 迁移及 VEGF 的表达[J]. 中国修复重建外科杂志, 2011,25(11):1371-1376.
- [4] Wang T, Tang WC, Sun SJ, et al. Mesenchymal stem cells improve outcomes of cardiopulmonary resuscitation in myocardial infarcted rats[J]. J Mol Cell Cardiol, 2009,46(3):378-384.

值比得到的数值低<sup>[12]</sup>。当 b 值增大时,微循环灌注的信号强度迅速衰减,b 值越大,ADC 值越小,越接近真实弥散值,因此磁共振 DWI 扫描时推荐选择较大的 b 值。当然,b 值也不是越高越好,当它达到一定值时,图像的质量就会下降<sup>[13]</sup>。本研究随着 b 值从 100 s/mm<sup>2</sup> 逐渐过渡到 800 s/mm<sup>2</sup>,ADC 值明显降低,逐渐接近真实弥散值。故本研究认为 b 值为 800 s/mm<sup>2</sup> 是磁共振 DWI 技术检测肝纤维化的最佳值。本研究在 b 值较大时,纤维化组和无纤维化组的 ADC 值差异较大,表明间质纤维化限制了水分子的弥散运动,从而使 ADC 值降低。进一步评估 ADC 值与肝脏炎症活动度分级和纤维化分期的关系。结果显示炎症活动度分级和纤维化分期越高,ADC 值越低。在 b 值为 800 s/mm<sup>2</sup> 时,各个分级及分期的 ADC 值差异较大,说明 ADC 值与乙型肝炎患者肝脏的炎症坏死程度和纤维化程度均密切相关。

综上所述,磁共振 DWI 技术在检查不同分期肝纤维化方面具有极大的优势,其中,在 b 值为 800 s/mm<sup>2</sup> 时,不同分期肝纤维化 ADC 值差异较大,值得在临床上推广应用。

#### 参考文献

- [1] 蒲永莉,王丹,李勇华,等. 肝炎后肝硬化代偿期不同证型肝纤维化指标的研究[J]. 重庆医学,2011,40(20):2005-2007.
- [2] 杨静. 肝纤维化的磁共振研究应用进展[J]. 重庆医学,2012,41(10):1006-1009.
- [3] 张冬艳,薛雁山. 磁共振扩散成像肝脾 ADC 比值评价肝纤维化程度的研究[J]. 中国 CT 和 MRI 杂志,2012,10(3):46-49.
- [4] 张兰,石喻,卞胜昕,等. 氧气刺激的 BOLD 磁共振成像  $\Delta R_2^*$  值评估鼠肝纤维化的初步实验研究[J]. 中国临床医学影像杂志,2013,24(3):174-177.
- [5] 孙骏,施裕新,张志勇,等. 肝纤维化磁共振 ADC 值与病理学分期的相关性研究[J]. 实用放射学杂志,2010,26

(11):1609-1612.

- [6] Hayashi T, Miyati T, Takahashi J, et al. Diffusion analysis with triexponential function in liver cirrhosis[J]. J Magn Reson Imaging,2013,38(1):148-153.
- [7] Sandrasegaran K, Tahir B, Patel A, et al. The usefulness of diffusion-weighted imaging in the characterization of liver lesions in patients with cirrhosis[J]. Clin Radiol,2013,68(7):708-715.
- [8] Cece HS, Ercan A, Yildiz S, et al. The use of DWI to assess spleen and liver quantitative ADC changes in the detection of liver fibrosis stages in chronic viral hepatitis[J]. Eur J Radiol,2013,82(8):E307-312.
- [9] Chandarana H, Do RK, Mussi TC, et al. The effect of liver Iron deposition on hepatic apparent diffusion coefficient values in cirrhosis[J]. AJR Am J Roentgenol,2012,199(4):803-808.
- [10] 范国华,龚建平,沈钧康,等. MR 扩散加权成像在大鼠肝纤维化诊断中的价值[J]. 中华放射学杂志,2013,47(2):172-177.
- [11] 程悦,沈文,祁吉. MR 扩散加权成像和 CT 灌注成像对肝纤维化诊断价值的比较[J]. 中国医学影像技术,2010,26(2):297-300.
- [12] Klasek J, Lanzman RS, Wittsack H, et al. Diffusion-weighted imaging (DWI) of the spleen in patients with liver cirrhosis and portal hypertension[J]. Magn Reson Imaging,2013,31(7):1092-1096.
- [13] 石喻,郭启勇,廖伟,等. MR 扩散加权成像评价慢性病毒性肝炎肝纤维化的临床研究[J]. 中华放射学杂志,2010,44(1):65-69.

(收稿日期:2014-12-15 修回日期:2015-02-26)

(上接第 1875 页)

- [5] Lu G, Haider HK, Jiang SJ, et al. Sca-1(+) stem cell survival and engraftment in the infarcted heart dual role for Preconditioning-Induced connexin-43 [J]. Circulation,2009,119(19):2507-2587.
- [6] Phillips MI, Tang YL. Genetic modification of stem cells for transplantation[J]. Adv Drug Deliv Rev,2008,60(2):160-172.
- [7] Zhao YL, Zhang S, Zhou JY, et al. The development of a tissue-engineered artery using decellularized scaffold and autologous ovine mesenchymal stem cells[J]. Biomaterials,2010,31(2):296-307.
- [8] Zhang ZY, Teoh SH, Chong MS, et al. Neo-vascularization and bone formation mediated by fetal mesenchymal stem cell tissue-engineered bone grafts in critical-size femoral defects[J]. Biomaterials,2010,31(4):608-620.
- [9] Psaltis PJ, Zannettino AC, Worthley SG, et al. Concise review: mesenchymal stromal cells: potential for cardiovascular repair[J]. Stem Cells,2008,26(9):2201-2210.
- [10] Vause CV, Durham PL. Calcitonin gene-related peptide differ-

entially regulates gene and protein expression in trigeminal glia cells: Findings from array analysis[J]. Neurosci Lett,2010,473(3):163-167.

- [11] Deng WW, St Hilaire RC, Chattergoon NN, et al. Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation in vitro by genetically engineered marrow stromal cells secreting calcitonin gene-related peptide[J]. Life Sci,2006,78(16):1830-1838.
- [12] Bullen ML, Miller AA, Andrews KL, et al. Nitroxyl (HNO) as a vasoprotective signaling molecule[J]. Antioxid Redox Signal,2011,14(9):1675-1686.
- [13] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>( $\Delta\Delta C_T$ ) method[J]. Methods,2001,25(4):402-408.
- [14] 徐格,许建中,周强,等. CGRP 对人骨髓间充质干细胞增殖影响的研究[J]. 华南国防医学杂志,2008,(2):21-24.

(收稿日期:2014-12-10 修回日期:2015-02-16)