

技术方法

DOI:10.11699/cyxb20130621

小鼠 CD200 基因重组腺病毒载体的构建及鉴定

王 琼¹, 陈冬梅², 王立斌², 魏 军¹, 李玉奎²

(1. 宁夏医科大学检验学院, 银川 750004; 2. 宁夏医科大学总医院宁夏人类干细胞研究所, 银川 750004)

【摘要】目的:构建携带小鼠 CD200 基因的重组腺病毒载体,并鉴定其在小鼠胰腺内皮细胞(mile sven 1, MS1)中 mCD200 基因的表达情况。**方法:**mCD200 基因亚克隆至腺病毒穿梭质粒 pYr-adshuttle-4, 获得重组质粒 pYr-ads-4-mCD200。从该重组质粒上利用 LR(attL×attR)特异性同源重组的方法,将 mCD200 表达框构建至腺病毒骨架质粒 pAd/PL-DEST 上,获得的重组腺病毒质粒经 Pac I 酶切,转染 HEK293 细胞,包装成重组腺病毒 rAd-4-mCD200,并用酶切和 PCR 等鉴定。采用 TCID₅₀(tissue cell infectious dosage 50, TCID₅₀)法测定重组腺病毒滴度。同时在 HEK293 细胞中进行病毒扩增,并感染小鼠内皮细胞 MS1,通过荧光显微镜、real-time PCR 检测 MS1 中小鼠 CD200 基因的表达。**结果:**PCR 鉴定重组腺病毒证实重组腺病毒 rAd-4-mCD200 构建成功;扩增后检测病毒滴度约为 $10^9 \sim 10^{10}$ pfu/ml;荧光显微镜及 real-time PCR 检测发现该重组腺病毒能在 MS1 细胞中高效的表达。**结论:**构建的重组腺病毒 rAd-4-mCD200 在 MS1 细胞中成功表达 mCD200 基因,为下一步开展关于 CD200 基因免疫抑制调节等相关研究奠定了基础。

【关键词】腺病毒载体;CD200;免疫调节**【中国图书分类法分类号】**R318.06**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2012-10-12

Construction and identification of recombinant adenovirus vector containing mouse CD200 gene

WANG Qiong¹, CHEN Dongmei², WANG Libin², WEI Jun¹, LI Yukui²

(1. Department of Medical Laboratory; 2. Ningxia Human Stem Cell Institute, General Hospital of Ningxia Medical University)

【Abstract】Objective: To construct the recombinant adenovirus vector containing mouse CD200 gene and to detect its expression in mice pancreas endothelial cells(mile sven 1, MS1). **Methods:** mCD200 gene was subcloned into the shuttle plasmid pYr-adshuttle-4 and recombinant plasmid pYr-ads-4-mCD200 was acquired. After that mCD200 mRNA expression frame was transferred to pAd/PL-DEST adenovirus vector via LR(attL×attR) in vitro homologous recombination from pYr-ads-4-mCD200. Recombinant adenovirus plasmid was digested by Pac I and transfected into HEK 293 cells and packaged out recombinant adenovirus rAd-4-mCD200, which was identified by digestion and PCR analysis. Virus titer was measured by the tissue cell infectious dosage 50(TCID₅₀) method. Meanwhile, adenovirus was amplified in HEK 293 cells and used to infect MS1 cells. Expression of mCD200 gene was measured by fluorescence microscope and real-time PCR. **Results:** PCR identification demonstrated the construction of recombinant adenovirus carrying rAd-4-mCD200 was successful and its titer was about $10^9 \sim 10^{10}$ pfu/ml after amplification. Through the fluorescence microscope and real-time PCR, recombinant adenoviral vector of mCD200 gene was constructed successfully in the MS1 cells. **Conclusions:** MS1 cells infected by constructed adenovirus vector rAd-4-mCD200 could express mCD200 successfully and may provide the foundation for the next step to carry out the CD200 gene immunosuppression regulation and other related study.

【Key words】adenovirus vector; CD200; immunoregulation

作者介绍: 王 琼, Email: chongziqiong@163.com,

研究方向: 干细胞生物学。

通信作者: 李玉奎, Email: yukuili@hotmail.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号:30960176); 宁夏自然科学基金基金资助项目(编号:NZ11262)。

CD200 也称 OX-2、MRCOX2、MOX2,属于白细胞分化抗原,由 McMaster 和 Williams^[1]于 1979 年发现,与其受体 CD200R 均属于免疫球蛋白超家族,广泛表达于胸腺细胞、B 细胞、活化的 T 细胞、血管内皮细胞、滤泡状树突细胞及外周神经元^[2-4]。CD200 的受体(CD200R)表达在髓样细胞上,是一种细胞表面糖蛋白,最近研究发现 CD200R 也表达于某些 T 细胞亚群^[5]。目前研究已经证实 CD200 与其受体(CD200R)的特异性结合,能够抑制细胞的免疫活性^[6],可减轻多种自身免疫性疾病的症状^[7]、延长同种或异种移植物存活时间^[8]等。目前 CD200 分子已成为移植免疫领域里的一个新的研究热点。为深入探讨该基因的功能,本研究通过体外 LR 重组的方法,成功构建了携带小鼠 CD200 基因的重组腺病毒载体并制备重组腺病毒,为进一步在体内、外水平进行 mCD200 基因功能的研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验所需的 mCD200 基因(pUC57-Simple-mCD200)和腺病毒穿梭质粒 pYr-adshuttle-4 购自长沙赢润生物技术有限公司;腺病毒骨架质粒 pAd/PL-DEST、LR 重组酶购自 Invitrogen 公司;PCR 酶、限制性内切酶均购自 Takara 公司;T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司;质粒提取试剂盒及病毒 DNA 提取试剂盒购自中鼎公司;METAFACTENE™ 脂质体转染试剂购自 Biontex 公司;HEK293 细胞购自美国 ATCC 细胞中心;小鼠胰腺内皮细胞系(MS1)购自中国科学院细胞库;培养细胞所需的 DMEM 培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自 GIBCO 公司;重组质粒、大肠杆菌 DH5 α 为本室保存。

1.2 方法

1.2.1 mCD200 基因克隆至腺病毒穿梭质粒 用 *EcoR* I/*Bam*HI 将 mCD200 基因(pUC57-Simple-mCD200)及目的载体 pYr-adshuttle-4 双酶切,1.0%琼脂糖凝胶电泳回收目的片段,用 T4 DNA 连接酶 16 ℃连接过夜,取 10 μ l 连接产物转化入感受态大肠杆菌 DH5 α 。次日挑取卡那(Kana)选择性培养基(终浓度为 50 mg/L)筛选的阳性克隆菌落接种于含 Kana 抗性的 LB(Luria-bertani)培养液中,37 ℃恒温摇床(250 r/min)振荡培养过夜。随机挑选卡那霉素抗性菌落扩增后小量提取质粒并做酶切鉴定(图 1A),命名为 pYr-ads-4-mCD200。酶切鉴定正确的 pYr-ads-4-mCD200,由上海英俊生物技术有限公司测序,将 pYr-ads-4-mCD200 的测序报告与目的序列相对比,显示获得的 mCD200 基因片段序列完全正确。

1.2.2 采用 LR 体外同源重组将 mCD200 基因克隆至腺病毒骨架质粒 pAd/PL-DEST 在 10 μ l LR 体外同源重组反应体系中,加入蛋白酶 K 消化 LR 重组酶 II, pYr-ads-4-mCD200

与腺病毒骨架质粒 pAd/PL-DEST 在 LR 重组酶 II 作用下进行体外重组反应。将上步反应产物转化感受态细胞 DH5 α ,涂布到含氨苄青霉素(Amp^r)抗性(终浓度为 100 μ g/ml)的 LB 平板上,37 ℃培养箱培养过夜。随机挑取若干单克隆菌落,接种于 50 ml 含 Amp^r 抗性(终浓度为 100 μ g/ml)的 LB 培养液中,37 ℃恒温摇床(250 r/min)培养过夜。将对数生长期的菌液加入 LB 培养基中,摇菌过夜,大量提取质粒,对 *Xba* I 单酶切鉴定正确的重组腺病毒骨架质粒,命名为 pAd-4-mCD200。

1.2.3 重组腺病毒 rAd-4-mCD200 的包装 转染前 1 d 将 HEK293 细胞悬液以 1.5×10^6 个的细胞量接种在 60 mm 培养皿中,转染前 1 h,换成无血清的 DMEM 培养基 5 ml。用 *Pac* I 单酶切重组腺病毒质粒,酚:氯仿:异戊醇抽提,获得线性化的腺病毒 DNA,用 METAFACTENE™ 脂质体转染试剂,按 DNA:脂质体=1:3 的比例对达到 50%~70%融会度的 HEK293 细胞进行转染,转染后 24 h 换培养基为含 10%FBS 的完全培养基。转染 3 d 后每天观察细胞病态反应(cytopathic effect, CPE)。当有明显的 CPE 现象且有>50%的细胞脱壁时即收集细胞,加入无菌 PBS 缓冲液重悬,反复冻融 3 次(-80 ℃~37 ℃)以裂解细胞,室温下 1 000 $\times$ g 离心 15 min,收集上清液,0.22 μ m 微孔滤膜过滤除菌,将 250 μ l 上清液装于 1.5 ml EP 管中置-74 ℃保存,另外 250 μ l 用于后续的感染步骤。

1.2.4 重组腺病毒的扩增 以相同密度同时接种 HEK293 细胞至 1 个 T75 细胞培养瓶,当细胞融合至约 50%~70%时,更换含 10%FBS 的 DMEM 培养基至 10~15 ml,加入 250 μ l 以上步骤所得细胞裂解上清液。24~48 h 后观察,60%左右细胞变圆,出现 CPE 现象且有 50%的细胞脱壁时,轻轻吹打收集细胞悬液,800 r/min,离心 5 min,弃上清得细胞沉淀,以无菌 PBS 2 ml 重悬细胞沉淀,液氮及 37 ℃水浴反复冻融、振荡 3 次,于 4 ℃,5 000 r/min 离心 20 min,收集病毒上清液于-74 ℃保存。将上步获得的细胞裂解液,用病毒基因组 DNA 提取试剂盒提取病毒 DNA。以之为模板进行 PCR 鉴定。将包含 mCD200 DNA 的重组腺病毒命名为 rAd-4-mCD200。

1.2.5 TCID₅₀ 法测定重组腺病毒滴度 在 2 块 96 孔板接种密度为以 1×10^4 个/孔的密度接种的 HEK293 细胞,将 100 μ l 病毒浓缩液行 10 倍梯度稀释,将 0.1 ml 各稀释度的病毒稀释液接种于 96 孔板中,每个稀释度的病毒液加入每排 10 孔中,最后 2 孔为对照,5%CO₂、37 ℃培养箱中培养 10 d,观察每孔细胞形态以及绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)表达情况,并计算病毒滴度。

1.2.6 重组腺病毒的鉴定 PCR 检测重组腺病毒中的 mCD200 基因,设计引物为:CMV-f,5'-GCGTGGATAGCGG-TTTGA-3' (此引物在 CMV 启动子上),mCD200-583-r,5'-TAGCAGCCCTCATCTTCC-3' (此引物在 mCD200 上)。取 5 μ l 病毒液及 10 μ l 培养上清与 1 μ l 蛋白酶 K(20 g/L)在 55 ℃作用 2 h,煮沸 5 min,冰浴中冷却 10 min,离心后取 2 μ l 上清做模板进行 PCR 鉴定。PCR 反应参数为:94 ℃ 20 s,55 ℃ 25 s,72 ℃ 55 s,30 个循环;再于 72 ℃延伸 3 min。

1.2.7 Real-time PCR 检测重组腺病毒 mCD200 基因表达

将病毒液感染小鼠胰腺内皮细胞(MS1),培养 48 h 后,提取细胞总 RNA,然后逆转录合成 cDNA 第 1 链,以 real-time PCR 检测 mCD200 基因的表达。

2 结果

2.1 pYr-ads-4-mCD200 腺病毒穿梭载体鉴定

将 mCD200 基因片段进行琼脂糖凝胶电泳,在 GIS 凝胶系统中检测,出现 mCD200 片段的条带(约 894 kb),结果见图 1A),与预期结果相同。将 mCD200 片段亚克隆至 pYr-adshuttle-4 载体,阳性克隆经 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切,在 1.0%琼脂糖凝胶中电泳,可见约 894 kb 的片段带和约 7 310 kb 的载体带(图 1B),初步推测 mCD200 基因片段已经克隆到 pYr-adshuttle-4 载体,与预期结果相同。将酶切鉴定正确的 pYr-ads-4-mCD200 送到上海英俊公司测序,将测序报告与欲得到的目的序列相比对,显示获得的 mCD200 基因片段序列完全正确。证实 pYr-ads-4-mCD200 腺病毒穿梭载体构建成功。

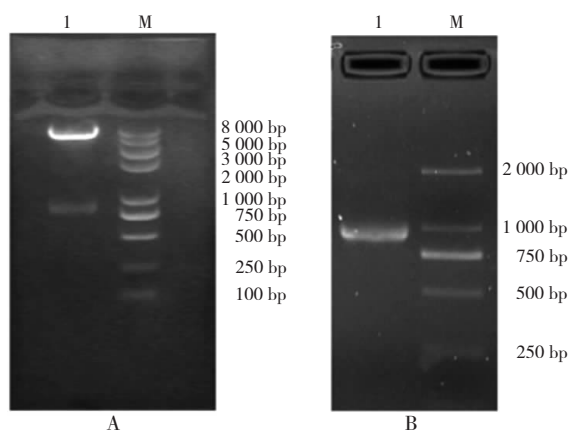
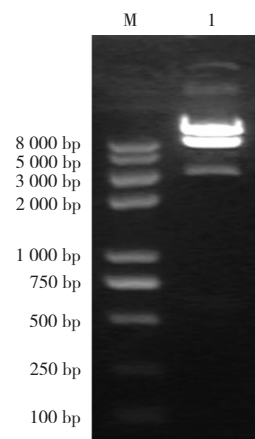


图 1 腺病毒重组质粒 pYr-ads-4-mCD200 及 mCD200 基因片段的鉴定

Fig.1 Identification of adenovirus recombinant plasmid pYr-ads-4-mCD200 and mCD200 gene

2.2 重组腺病毒载体 pAd-4-mCD200 的酶切鉴定

将 mCD200 采用 LR 体外同源重组技术克隆至 pAd/PL-DEST 腺病毒表达载体上,阳性克隆经 *Xba*I 酶切鉴定,正确的克隆将切出 1 条约 550 bp 和 1 条约 4 kb 的小条带,且大带大于 8 kb(实际有 3 条大带,18、8、8 kb,但是一般很难分开,所以看上去就是 1 条粗带)。初步推测 mCD200 基因片段已经克隆到 pAd/PL-DEST 载体,阳性克隆命名为 pAd-4-mCD200(图 2)。将 pAd-4-mCD200 送去测序,测序引物为 CMV-f。将测序序列与目的序列进行比对,显示序列完全正确。



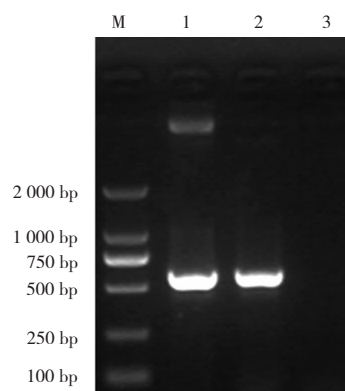
M. Marker; 1. pAd-4-mCD200 digested with *Xba*I

图 2 重组腺病毒载体 pAd-4-mCD200 的酶切鉴定

Fig.2 Restriction enzyme digestion of pAd-4-mCD200 by agarose gel electrophoresis

2.3 重组腺病毒 rAd-4-mCD200 的 PCR 鉴定

提取重组腺病毒基因组 DNA,设计 mCD200 的引物并扩增 mCD200 基因片段,以检测重组腺病毒 rAd-4-mCD200 是否构建正确。将 mCD200 片段的 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,在 GIS 凝胶系统中检测,出现 mCD200 片段的条带(约 583 bp),结果见图 3。由 PCR 鉴定结果可知,此腺病毒中有 mCD200 基因且 CMV 启动子也在,说明相关表达框都在。rAd-4-mCD200 包装成功。



M. Marker; 1. pYr-ads-4-mCD200 阳性质粒对照; 2. rAd-4-mCD200; 3. 阴性对照

图 3 重组腺病毒 rAd-4-mCD200 的 PCR 鉴定

Fig.3 Analysis of PCR products of rAd-4-mCD200 by agarose gel electrophoresis

2.4 重组腺病毒的扩增及滴度测定

病毒感染 12 h 后,荧光显微镜下即可见少量 GFP 表达,随着时间的延长,绿色荧光逐渐增多增强,48 h 后可见感染 rAd-4-mCD200 病毒的 HEK293 已全部表达绿色荧光,表明病毒在 HEK293 细胞中扩增。感染 10 d 后呈现明显 CPE 现象:细胞肿胀,变圆,细胞核变大,出现病毒空斑(图 4)。经测定病毒滴度为 $10^9 \sim 10^{10}$ pfu/ml。

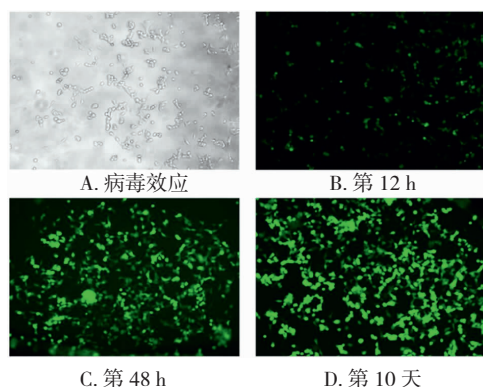


图 4 腺病毒在 HEK293 细胞的检测
(荧光显微镜及普通显微镜, 10×)

Fig.4 Detection of adenovirus in HEK293 cell
(fluorescence microscope and ordinary microscope, 10×)

2.5 重组腺病毒 rAd-4-mCD200 感染小鼠胰腺内皮细胞

采用 rAd-4-mCD200 重组腺病毒感染小鼠胰腺内皮细胞 (MS1)。MS1 细胞被病毒感染后 48 h, 细胞皱缩变小, 形态不规则, 细胞间隙增大, 荧光显微镜下观察可见明显的绿色荧光 (图 5B)。

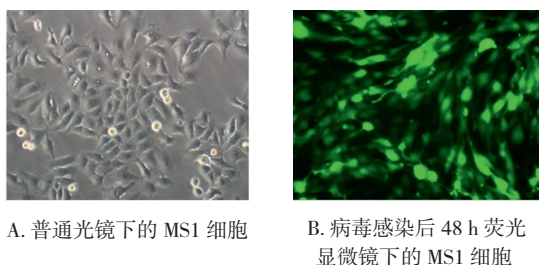


图 5 正常及 rAd-4-mCD200 感染后 MS1 细胞形态
(荧光显微镜及普通显微镜, 20×)

Fig.5 Morphological observation of MS1 cells and
rAd-4-mCD200-transfected MS1 cells
(fluorescence microscope and ordinary microscope, 20×)

2.6 Real-time PCR 检测 rAd-4-mCD200 基因表达

病毒感染 MS1 细胞后, 提取 RNA 并逆转录经 real-time PCR 检测, 可见感染组 mCD200 基因表达, 明显高于空病毒载体感染组 MS1 细胞中 mCD200 基因表达 ($P < 0.05$, 图 6)。

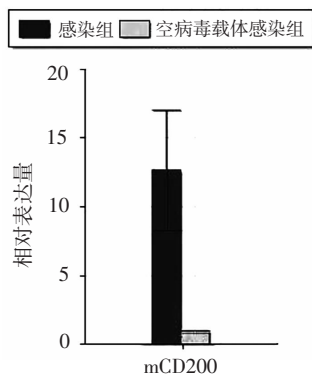


图 6 Real-time PCR 检测 rAd-4-mCD200 基因表达
Fig.6 rAd-4-mCD200 gene expressions detected
by real-time PCR

3 讨论

CD200 最初是用通过从大白鼠胸腺纯化的 Ia (免疫相关) 样糖蛋白免疫小鼠产生的一个单克隆抗体来定义的。CD200 是一种在多种组织及细胞中都有表达的免疫抑制分子, 如中枢和外周神经系统、胸腺细胞、B 细胞、滤泡状树突细胞、血管内皮细胞及卵巢细胞等。CD200 通过与 CD200 受体 (CD200R) 结合抑制髓性细胞 (包括巨噬细胞和粒细胞) 和部分 T 细胞的免疫反应。由于多数抗体不能通过血脑屏障, 故 CD200 参与的细胞免疫抑制是维持免疫平衡和避免自身免疫疾病的重要机制。动物实验表明, CD200 基因敲除小鼠的中枢神经中有过度增殖和自动活化的巨噬细胞, 并在实验性神经损伤部位聚集过量的活化巨噬细胞^[9]。

1985 年 Ballay 等^[10]报道用腺病毒作为一种基因载体以来, 腺病毒载体在基础实验研究中已取得长足发展, 目前重组腺病毒载体已成为目前基因治疗中应用最广泛的生物病毒载体^[11-13]。重组腺病毒载体感染效率高、宿主细胞范围广泛, 体内外均能有效感染分裂期和静息期的细胞, 外源基因表达水平高, 重组腺病毒的大规模制备相对容易, 并且病毒滴度高, 能满足临床的需要。

本研究中采用 LR 同源重组的方法构建了 mCD200 重组腺病毒, 其滴度为 $10^9 \sim 10^{10}$ pfu/ml, 该病毒的滴度已经能很好地满足当前体外实验研究的需要。重组 mCD200 腺病毒经 PCR 和酶切鉴定构建正确。将此重组腺病毒感染小鼠内皮细胞系 MS1, 经 GFP 和 real-time PCR 鉴定, rAd-4-mCD200 可高效感染小鼠 MS1 细胞, 并能够成功表达外源导入的 mCD200 基因。本研究应用上述方法, 最终成功构建了携带 mCD200 基因的重组腺病毒 rAd-4-mCD200, 为下一步利用动物实验进行重组腺病毒 rAd-4-mCD200 在体内外表达及其功能的研究奠定了良好的基础。

参考文献

- [1] McMaster W R, Williams A F. Identification of Ia glycoproteins in rat thymus and purification from rat spleen[J]. Eur J Immunol, 1979, 9 (6): 426-433.
- [2] Darmochwal-Kolarz D A, Kludka-Sternik M, Chmielewski T, et al. The expressions of CD200 and CD200R molecules on myeloid and lymphoid dendritic cells in pre-eclampsia and normal pregnancy[J]. Am J Reprod Immunol, 2012, 67 (6): 474-481.

技术方法

DOI: 10.11699/cyxb20130622

微量脑脊液漏快捷定性的可行性研究

柳庆君¹, 张 芸², 张玲燕³, 董 钊¹, 王 杰¹, 张任飞⁴, 任红梅¹, 陈莉凌¹, 雷小燕¹

(1. 绵阳市中心医院耳鼻喉科, 绵阳 621000; 2. 绵阳市中心医院神经内科, 绵阳 621000;

3. 绵阳市中心医院预防保健科, 绵阳 621000; 4. 绵阳市第三人民医院检验科, 绵阳 621000)

【摘要】目的:通过自身配对研究,探讨对极微量脑脊液快捷定性的可行性。**方法:**收集 44 例脑脊液标本,分别运用 Olympus au2700 全自动生化仪和 Johnson onetouch ultral 血糖仪试纸法检测其葡萄糖含量,分析两者之间的关系。**结果:**44 例标本通过 Johnson onetouch ultral 血糖仪试纸法测得的值均显著高于 Olympus au2700 全自动生化仪检测的糖含量,组间差异具有统计学意义($t=14.14, P<0.05$),两者呈正相关($r=0.97$),且经一元线性回归方程校正后,简易血糖仪与全自动生化仪检测的数据结果之间的差距无显著性($t=0.01, P>0.05$)。Johnson onetouch ultral 检测脑脊液葡萄糖含量的精确度为 95.7%,平均误差 0.12 mmol/L。**结论:**正确运用 Johnson onetouch ultral 简易血糖仪,配合现有的血糖试纸,在掌握校正读数值公式与方法前提下,可以准确检测脑脊液中的葡萄糖含量,藉此对标本进行快捷定性,开发专用检测脑脊液的脑糖仪及脑糖试纸条是切实可行的。

【关键词】脑脊液;脑脊液漏;定性;血糖仪**【中国图书分类法分类号】**R762**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2011-05-28

Research on the feasibility of easy identification of cerebral spinal fluid leakage with micro sample

LIU Qingjun¹, ZHANG Yun², ZHANG Lingyan³, DONG Chuan¹, WANG Jie¹, ZHANG Renfei⁴, REN Hongmei¹, CHEN Liling¹, LEI Xiaoyan¹

(1. Department of Otorhinolaryngology, Mianyang Central Hospital; 2. Department of Neuology, Mianyang Central Hospital; 3. Department of Prevention and Healthcare, Mianyang Central Hospital; 4. Department of Laboratory, the Third People's Hospital of Mianyang)

【Abstract】Objective: To discuss the feasibility of easy identification of cerebral spinal fluid leak with micro sample through self control study. **Methods:** Totally 44 cerebral spinal fluid samples were collected. Olympus au2700 automatic biochemical analyzer and

作者介绍: 柳庆君, Email: 54zly@163.com,

研究方向: 小儿耳鼻喉基础与临床。

[3] Najar M, Raicevic G, Jebbawi F, et al. Characterization and functionality of the CD200-CD200R system during mesenchymal stromal cell interactions with T-lymphocytes[J]. Immunol Lett, 2012, 146(1-2): 50-56.

[4] Dentesano G, Straccia M, Ejarque-Ortiz A, et al. Inhibition of CD200R1 expression by C/EBP beta in reactive microglial cells[J]. J Neuroinflammation, 2012, 9: 165.

[5] Chakera A, Bennett S C, Morteau O, et al. The phenotype of circulating follicular-helper T cells in patients with rheumatoid arthritis defines CD200 as a potential therapeutic target[J]. Clin Dev Immunol, 2012. doi: 10.1155/2012/948218 [Epub ahead of time].

[6] Rosenblum M D, Yancey K B, Olasz E B, et al. CD200, a 'no danger' signal for hair follicles[J]. J Dermatol Sci, 2006, 41(3): 165-174.

[7] Li Y, Zhao L D, Tong L S, et al. Aberrant CD200/CD200R1 expression and function in systemic lupus erythematosus contributes to abnormal T-cell responsiveness and dendritic cell activity[J]. Arthritis Res Ther, 2012, 14(3): R123.

[8] Binet I, Wood K J. In vivo models of inflammation: immune rejection

and skin transplantation in vivo[J]. Methods Mol Biol, 2003, 225: 239-248.

[9] Hoek R M, Ruuls S R, Murphy C A, et al. Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX2 (CD200)[J]. Science, 2000, 290(5497): 1768-1771.

[10] Ballay A, Levrero M, Buendia M A, et al. In vitro and in vivo synthesis of the hepatitis B virus surface antigen and of the receptor for polymerized human serum albumin from recombinant human adenoviruses[J]. EMBO J, 1985, 4(13B): 3861-3865.

[11] Jager L, Ehrhardt A. Emerging adenoviral vectors for stable correction of genetic disorders[J]. Curr Gene Ther, 2007, 7(4): 272-283.

[12] Treacy O, Ryan A E, Heinzl T, et al. Adenoviral transduction of mesenchymal stem cells: in vitro responses and in vivo immune responses after cell transplantation[J]. PLoS One, 2012, 7(8): e42662.

[13] Zhang Y, Li W, Ou L, et al. Targeted delivery of human VEGF gene via complexes of magnetic nanoparticle-adenoviral vectors enhanced cardiac regeneration[J]. PLoS One, 2012, 7(7): e39490.

(责任编辑: 关蕴良)