

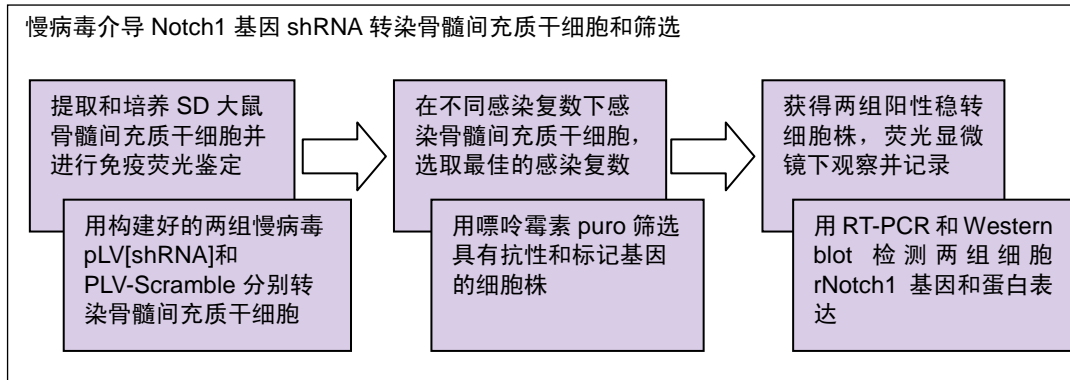
# 慢病毒介导Notch1基因shRNA沉默大鼠骨髓间充质干细胞 Notch信号通路的表达

闫锦玉, 邢万红(山西医科大学, 山西省太原市 030001)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1704

ORCID: 0000-0003-0395-542X(闫锦玉)

文章快速阅读:



闫锦玉, 男, 1990 年生, 山西省交城县人, 汉族, 2019 年山西医科大学毕业, 硕士研究生, 主要从事心肌组织工程研究。

通讯作者: 邢万红, 博士, 副主任医师, 山西医科大学, 山西省太原市 030001

文献标识码:A  
稿件接受: 2019-01-10



## 文题释义:

**慢病毒载体:** 是基于人免疫缺陷 I 型病毒工程改造的病毒载体系统。它区别于具有分裂和非分裂细胞转染能力的一般反转录病毒载体, 能有效地将目的基因(或 RNAi)引入动物和人的原代细胞或细胞系中, 具有高效率、高稳定性, 而且很少诱发宿主免疫反应的优点。因此, 慢病毒载体介导的 RNAi 已经成为多数研究者的首选。  
**增强型绿色荧光蛋白基因:** 作为一种新型的报告基因, 增强型绿色荧光蛋白已在许多研究领域得到应用。利用绿色荧光蛋白独特的发光机制, 可将增强型绿色荧光蛋白作为蛋白质标签, 即利用 DNA 重组技术, 将目的基因与增强型绿色荧光蛋白基因构成融合基因, 转染合适的细胞进行表达, 然后借助荧光显微镜进行观察。由于增强型绿色荧光蛋白相对较小, 只有 238 个氨基酸, 将其与其他蛋白融合后不影响自身的发光功能。

## 摘要

**背景:** 对于骨髓间充质干细胞向心肌细胞分化中 Notch 信号通路的机制研究较多, 但是沉默 Notch 信号通路在工程化心肌样组织血管网络中的机制研究还比较少。

**目的:** 构建慢病毒载体介导 Notch1 基因 shRNA 表达体系, 观察骨髓间充质干细胞中 rNotch 基因沉默效果。

**方法:** 构建 pLV[shRNA]-EGFP: T2A: Puro- U6{ rNotch1[ shRNA]\_19 nt}(PLV-Notch)和 pLV[shRNA]-EGFP: T2A:Puro-U6>Scramble\_shRNA(PLV-Scramble)拼装慢病毒表达载体, 并将该慢病毒载体包装质粒形成混合物共转染到 HEK-293T 细胞中。收集慢病毒悬液, 通过定量 PCR 检测重组病毒滴度。将构建的 PLV-Notch 与 PLV-Scramble 分别感染骨髓间充质干细胞, 经荧光显微镜观察和 RT-qPCR、Western blot 鉴定转染后两组骨髓间充质干细胞中增强型绿色荧光蛋白基因和目的基因 rNotch1 表达情况。

**结果与结论:** 慢病毒载体滴度大于  $1 \times 10^8$  TU/mL, 稳定转染筛选得到成熟的细胞株。病毒转导效果良好, 荧光率达 80%, rNotch1 基因在干扰组中的表达量是 scrambled 对照组的 75.2%。由此可见, 慢病毒介导转染 rNotch1 基因的骨髓间充质干细胞稳转株构建成功, 并对 Notch 信号通路的表达有沉默作用。

## 关键词:

骨髓间充质干细胞; Notch 基因; 慢病毒载体; RNA 干扰; Notch 信号通路; 山西省自然科学基金

中图分类号: R459.9; R394.2

## 基金资助:

山西省自然科学基金(201601D011094), 项目负责人: 邢万红

## Lentiviral-mediated shRNA silencing of Notch-1 inhibits expression of Notch signaling pathway in rat bone marrow mesenchymal stem cells

Yan Jinyu, Xing Wanhong (Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China)

## Abstract

**BACKGROUND:** Number studies have insight into the mechanism of Notch signaling pathway in the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into cardiomyocytes, but the mechanism of silencing Notch signaling pathway in the engineered myocardial-like tissue vascular network is less elucidated.

Yan Jinyu, Master candidate, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

Corresponding author: Xing Wanhong, MD, Associate chief physician, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

**OBJECTIVE:** To investigate the role of Notch signaling pathway in bone marrow mesenchymal stem cells in the construction of engineered myocardial-like tissue vascular network.

**METHODS:** The lentivirus expression vector was constructed by pLV[shRNA]-EGFP: T2A: Puro-U6 [rNotch1 [shRNA]<sub>19 nt</sub>](PLV-Notch) and pLV[shRNA]-EGFP: T2A: Puro-U6>Scramble\_shRNA(PLV-Scramble) and packaged with the lentivirus vector. The mixture was co-transfected into HEK-293 T cells. The lentivirus suspension was collected and the titer of recombinant virus was detected by quantitative PCR. The constructed PLV-Notch and PLV-Scramble were infected with bone marrow mesenchymal stem cells respectively. The expression of enhanced green fluorescent protein gene and target gene rNotch1 in the transfected cells was identified by fluorescence microscopy, RT-qPCR and western blot.

**RESULTS AND CONCLUSION:** The titer of lentivirus vector was more than  $1 \times 10^8$  TU/mL. The mature cell lines were screened. The fluorescence rate of the two transfection groups was 80%, and the expression of rNotch1 gene in the interference group was 75.2% of that in the scrambled group. Therefore, lentiviral-mediated rNotch1 gene transfection of bone marrow mesenchymal stem cells can be successfully constructed and silence the expression of Notch signal pathway.

**Key words:** bone marrow mesenchymal stem cells; Notch gene; lentiviral vector; RNA interference; Notch signaling pathway; Natural Science Foundation of Shanxi Province

**Funding:** the Natural Science Foundation of Shanxi Province, No. 201601D011094 (to XWH)

## 0 引言 Introduction

大鼠骨髓间充质干细胞来源于中胚层, 具有多向分化潜能和自我复制能力, 理论上在适当的诱导条件下可以分化为任何中胚层细胞, 成为组织工程、基因工程理想的种子细胞<sup>[1]</sup>。目前, 基于骨髓间充质干细胞体外构建组织工程化心肌的研究已取得显著进展, 但是关于组织工程化心肌体外构建还存在一些技术难点, 其中新生血管生成较少和随之导致的细胞凋亡、心肌厚度异常等问题明显制约了工程化心肌组织在宿主体内的存活, 因此寻找调节骨髓间充质干细胞分化的相关信号通路, 研究其在构建工程化心肌血管化网络中的机制具有重要的临床意义。

前期相关研究表明, 骨髓间充质干细胞的分化受到微环境中氧体积分数、多种细胞因子及各种细胞信号通路的调控<sup>[2-3]</sup>。氧化应激诱导Notch信号转导可使得Notch基因表达上调, 促进间充质干细胞中心源性基因表达, 故而调节Notch活化和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>介导的氧化应激之间的平衡, 能够促进工程化心肌血管化网络生成, 用于心脏修复和再生治疗<sup>[4-5]</sup>。另有研究表明, Notch信号通路活性降低和左心室致密化不全这种先天性小儿心肌病的发生关系重大<sup>[6]</sup>。因此, 弄清楚Notch信号通路在骨髓间充质干细胞分化中的作用机制, 不仅能为临床相关先天性心肌病的病理和心脏修复再生作一解答, 或许也能为目前工程化心肌的血管化网络生成机制提供线索。

该实验从一个侧面探究Notch信号通路在被基因沉默表达之后, 其通路蛋白表达情况, 为后续Notch信号通路在构建组织工程化心肌血管化网络中起到的作用作一初步探索。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学体外探索性研究。

1.2 时间及地点 实验于2017年9月至2018年10月在山西医科大学转化医学中心实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 SD大鼠10只, 4周龄, 雌雄不限, 体重120-150 g, 购自山西医科大学动物中心, 许可证号为SCXK(晋)2009-0001。

1.3.2 实验材料和试剂 HEK293细胞(上海中科院细胞库); 构建的慢病毒载体(Cyagen Biosciences Inc.); 兔抗鼠rNotch多克隆抗体(Abcam公司); 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(H+L)(碧云天生物技术有限公司, A0208); RIPA裂解液、BCA试剂盒、BeyoECL Plus (碧云天生物技术有限公司); 兔内参抗体 $\beta$ -Tubulin(上海百研生物科技有限公司); 反转录试剂盒(Takara, 日本)。

1.4 实验方法

1.4.1 骨髓间充质干细胞的培养与免疫荧光鉴定<sup>[7-9]</sup> 颈椎脱臼法处死SD大鼠, 于超净台中无菌条件下游离双侧股骨及胫骨, 切除双侧骨骺端, 暴露骨髓腔, 用5 mL完全培养基冲出骨髓液于无菌平皿中, 再用无菌注射器在平皿内反复吹吸混匀, 将其制成单细胞悬液。用Ficoll淋巴分离液梯度离心上述单细胞悬液获得有核细胞层, 以骨髓间充质干细胞专用培养基培养, 倒置相差显微镜下观察细胞形态。选取CD90作为免疫荧光标记抗原进行鉴定。

### 骨髓间充质干细胞培养与鉴定

细胞来源:	采用密度梯度离心和贴壁法获取 SD 大鼠骨髓间充质干细胞
细胞培养基:	低糖 DMEM 培养基, 为 Gibco 公司产品
添加材料:	体积分数为 10% 胎牛血清
培养时间:	由细胞生长状态确定一般 7 d 左右传代
细胞传代:	细胞传代至第 3 代备用
细胞鉴定:	免疫荧光鉴定 CD90 表达呈阳性
伦理学批准:	该研究通过山西医科大学医学伦理委员会批准

1.4.2 rNotch1基因shRNA慢病毒载体的构建及稳转株的筛选 参照文献[10]分析结果, Notch1-siRNA(5'-CAA CUA CUA CCU CUG CUU AdT dT-3')设计得到shRNA靶点序列, 见图1。另外, 选择scrambled序列作为RNAi阴性转染组, 见图2。根据以上shRNA靶点序列, 分别设计合成正、反2条单链寡核苷酸链; 然后对载体进行酶切、退火、连接、转化、菌落鉴定等, 筛选合适的shRNA载体并用辅助质粒共转染到293T细胞中。对慢病毒载体进行浓缩纯

化, 通过荧光定量PCR法测定慢病毒滴度。将骨髓间充质干细胞接种入6孔板中, 培养过夜, 细胞汇合度达30%–50%可进行转染。向骨髓间充质干细胞加入感染复数值10, 30, 60的病毒稀释后培养液, 转染6 h左右观察细胞形态, 如出现细胞毒性, 应对其进行换液; 如无明显异常现象, 可延长转染时间, 培养过夜; 转染24 h后, 观察细胞状态, 更换培养基; 转染48 h后观察荧光, 如果细胞生长缓慢, 则可以适当延长观察时间。细胞稳定转染后, 经药物筛选的荧光率或细胞保留率可达80%或更高, 根据细胞增殖和形态确认最适感染复数值。

**1.4.3 Western blot检测rNotch1的表达** 收集干扰组与对照组骨髓间充质干细胞测定rNotch1的蛋白表达量。使用RIPA裂解液提取骨髓间充质干细胞总蛋白, BCA试剂盒测定蛋白质浓度。取10  $\mu$ g总蛋白上样, 8%SDS-PAGE凝胶电泳, 恒流300 mA转PVDF膜2 h; 5%脱脂牛奶封闭1 h, 用Western一抗稀释液稀释抗体, 兔rNotch1抗体稀释比例为1:1 000, 兔内参抗体 $\beta$ -Tubulin稀释比例为1:2 000, 4  $^{\circ}$ C翻转孵育过夜; 将膜用TBST洗涤3次, 置于HRP标记的羊抗兔二抗中(1:2 000稀释), 在室温下温育2 h, TBST连续洗涤3次; BeyoECL Plus显影, 暗室压片检测, 扫描条带, 然后用ImageJ计算每个条带的灰度值。

**1.4.4 RT-qPCR检测rNotch1 mRNA表达** 收集干扰组与对照组骨髓间充质干细胞测定rNotch1 mRNA相对表达量。按照TIANGEN总RNA提取试剂盒说明书提取骨髓间充质干细胞总RNA。按照Takara反转录试剂盒说明书反转录合成cDNA。荧光定量PCR反应程序: 95  $^{\circ}$ C预变性3 min; 95  $^{\circ}$ C变性15 s, 60  $^{\circ}$ C延伸30 s, 重复40个循环。以rGAPDH为内参基因, 按照 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算rNotch1 mRNA的相对表达量。实验重复3次, 取其平均值进行分析。rNotch1引物序列及内参引物序列见表1。

表1 rNotch1引物序列及内参引物序列

Table 1 rNotch1 primer sequence and control primer sequence

基因名称	引物名称	引物序列	片段大小
rGAPDH	rGAPDH-F	GAT GCT GGT GCT GAG TAT GT	104 bp
	rGAPDH-R	GCG GAG ATG ATG ACC CTT T	
rNotch1	rNotch1-F	CAC TAT GGT TTG TGC AAG GAT G	106 bp
	rNotch1-R	GCT GGC TGT GAC ACT CAT TA	

**1.5 主要观察指标** 慢病毒转染后rNotch1蛋白及mRNA表达量变化。

**1.6 统计学分析** 采用SPSS 21.0进行统计分析, 各组数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组内比较采用两独立样本 $t$ 检验统计方法,  $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 骨髓间充质干细胞培养与鉴定结果** 骨髓间充质干细胞没有特异性的表面抗原, 常表达多种基质和间质细胞

抗原, 实验通过前述实验方法培养到生长状态良好的细胞, 并选取CD90作为免疫荧光标记抗原进行鉴定, CD90阳性率>90%, 见图3。

**2.2 重组质粒载体的检测结果** 图4为赛业生物公司测序结果。

**2.3 获得稳转细胞株** 在感染复数值为30时, 嘌呤霉素筛选药物质量浓度为0.8 mg/L条件下, 荧光显微镜下可见大量绿色荧光标记的细胞, 细胞生长状态良好, 获得稳转细胞株, 见图5, 6。

**2.4 慢病毒转染后rNotch1蛋白表达变化** 对照组rNotch1灰度值与 $\beta$ -Tubulin灰度值比值为0.691 2, 干扰组rNotch1灰度值与 $\beta$ -Tubulin灰度值比值为0.644 3, 对照组相对定量值为1, 干扰组的表达量相对于对照组为0.932 1, 见图7。

**2.5 慢病毒转染后rNotch1 mRNA变化** rNotch1基因在干扰组中的表达量是scrambled对照组的75.2%。干扰组与对照组rNotch1基因表达量分别为 $21.69\pm 5.79$ ,  $21.81\pm 5.59$ , 通过统计学软件分析, 得出 $P > 0.05$ , 差异无显著性意义, rNotch1和rGAPDH的溶解曲线, 见图8。

## 3 讨论 Discussion

骨髓间充质干细胞构建组织工程化心肌过程中, 有多条信号通路起到重要调控作用, Notch信号通路就是其中最重要的一环。Notch信号通路在进化中高度保守, 主要通过相邻细胞间互相通讯对细胞增殖、分化、凋亡起到调控作用<sup>[11-13]</sup>。Notch信号通路由Notch受体、Notch配体(DSL蛋白)、CSL(CBF1 in humans, Suppressor of Hairless in *Drosophila* and LAG in *C. elegans*; also known as RBP-J in the mouse)、DNA结合蛋白、其他效应物 and Notch调节分子组成。在哺乳动物中有4类Notch信号受体(Notch 1、2、3、4)和5种配体(Jagged1、Jagged2和Delta-like 1(Dll1)、Dll3和Dll4)<sup>[14]</sup>。当配体与Notch信号受体胞外区结合后, 经过3次连续的剪切, 释放可溶性的Notch胞内部分(NICD), 随后NICD被转移至核内, 与CSL结合形成NICD/CSL转录激活复合体, 从而激活HES、HEY、HERP等转录抑制因子家族的靶基因, 发挥生物学作用<sup>[15]</sup>。有文献报道下调Notch1的表达, 沉默Notch信号通路, 可促进骨髓间充质干细胞向心肌细胞分化, 为构建工程化心血管网络提供细胞来源<sup>[16]</sup>。基于上述原理, 该实验采用慢病毒shRNA干扰的方法对Notch1基因进行定向沉默, 探究工程化心血管网络的生成机制。

慢病毒载体介导Notch1基因shRNA沉默大鼠骨髓间充质干细胞Notch信号通路表达, 是在病毒感染大鼠骨髓间充质干细胞后, 其携带的shRNA被转入骨髓间充质干细胞中并与其基因组相结合, 从而致使rNotch1基因表达沉默, 而shRNA可以在细胞中被稳定表达。因此, 可以通过检测rNotch1基因的蛋白表达来鉴定骨髓间充质干细胞中rNotch1基因沉默效果。

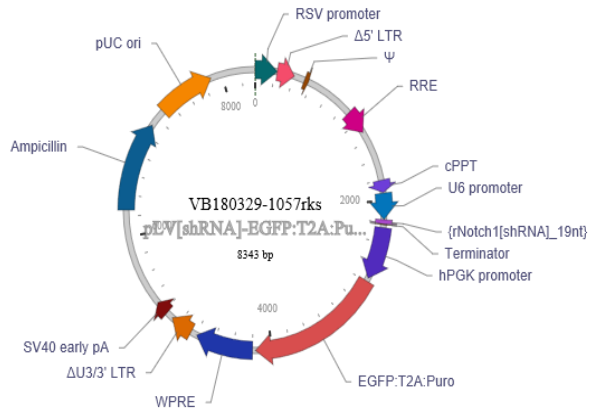


图1 pLV[shRNA]-EGFP:T2A:Puro-U6>{rNotch1[shRNA]\_19nt}干扰组

Figure 1 PLV [shRNA]-EGFP:T2A:Puro-U6>{rNotch1 [shRNA]\_19nt} interference group

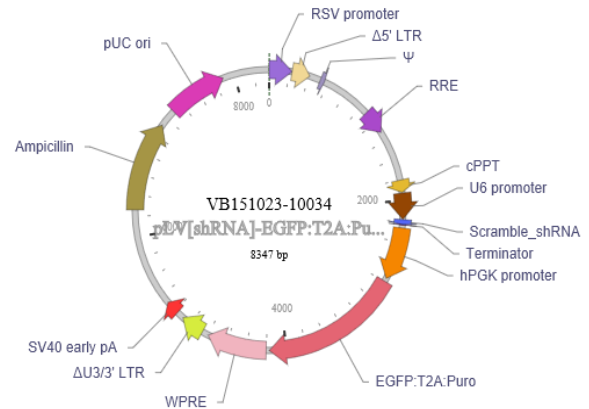
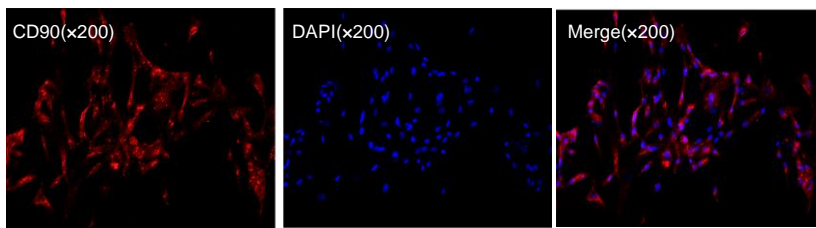


图2 pLV[shRNA]-EGFP:T2A:Puro-U6>Scramble\_shRNA 空白载体对照组

Figure 2 PLV[shRNA]-EGFP:T2A:Puro-U6>Scramble\_shRNA blank carrier control group

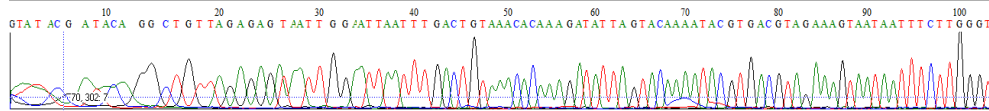


图注: 图中红色荧光为 CD90 阳性, 阳性率 > 90%, 即细胞纯度 > 90%。

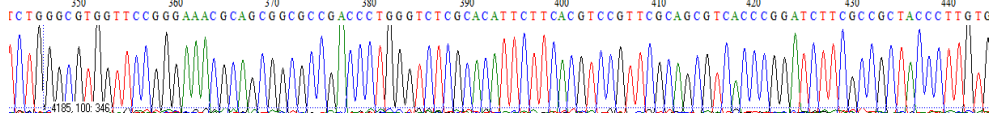
图3 骨髓间充质干细胞 CD90 免疫荧光染色

Figure 3 CD90 immunofluorescence staining of bone marrow mesenchymal stem cells

开始段



中间段



结尾段

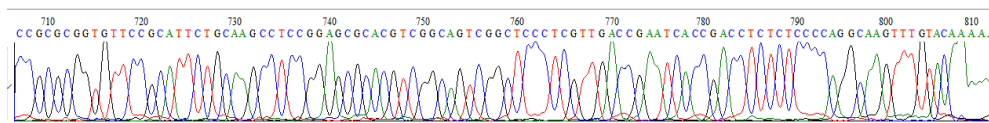
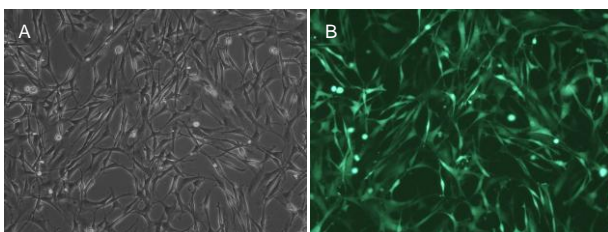


图4 重组质粒载体的检测结果

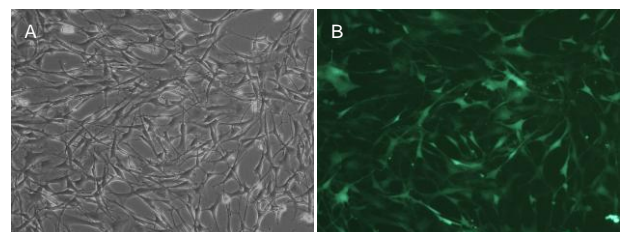
Figure 4 Detection of recombinant plasmid vectors



图注: A 为白光下; B 为荧光下。

图5 pLV[shRNA]慢病毒对骨髓间充质干细胞的感染(x100)

Figure 5 Infection of bone marrow mesenchymal stem cells with pLV[shRNA] lentivirus (x100)



图注: A 为白光下; B 为荧光下。

图6 Scramble\_shRNA 对骨髓间充质干细胞的感染(x100)

Figure 6 Transfection of bone marrow mesenchymal stem cells by Scramble\_shRNA (x100)

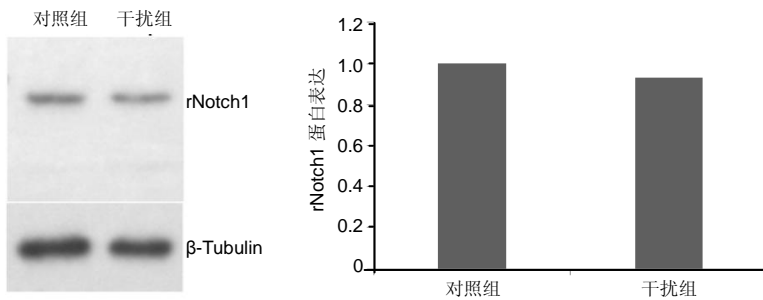
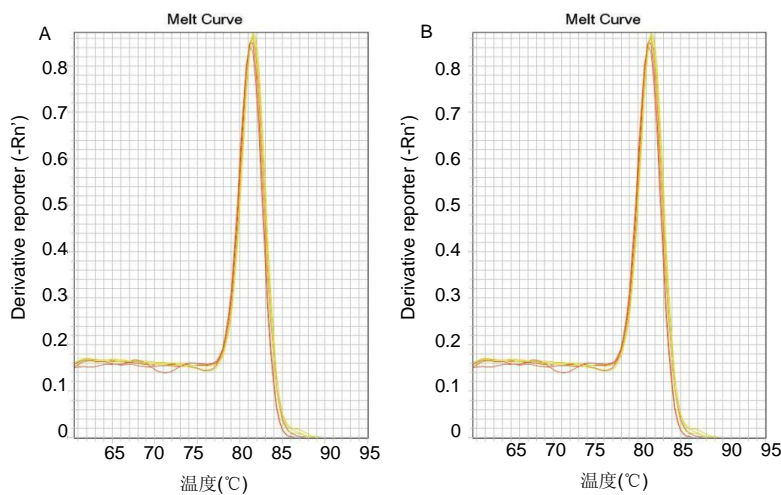


图7 Western blot检测各组骨髓间充质干细胞rNotch1蛋白表达  
Figure 7 Detection of rNotch1 protein expression in bone marrow mesenchymal stem cells by western blot



图注: 图中A为rNotch1的熔解曲线; B为rGAPDH的熔解曲线。  
图8 rNotch1和rGAPDH的熔解曲线  
Figure 8 Melting curves of rNotch1 and rGAPDH

邓海燕等<sup>[17-19]</sup>在骨髓间充质干细胞向心肌细胞分化过程中利用微小RNA等慢病毒体系干预,也观察到Notch信号通路相关蛋白的表达变化。国内关于骨髓间充质干细胞分化过程中信号通路的研究<sup>[20-24]</sup>,也证实了Notch信号通路在调节分化过程中的作用。在该实验中,设计了2条shRNA实现对Notch1基因沉默的探究,并检测稳转株之中Notch1蛋白的表达水平鉴定转染效果。经RT-qPCR和Western blot检测实验设计的shRNA对rNotch1基因有沉默效果。实验通过统计学软件分析,得出 $P > 0.05$ ,差异无显著性意义,可能由于实验过程中rNotch1基因有多个靶点,筛选到有较高干扰效率的干扰序列存在一定难度。另外,也存在转染等实验过程操作处理致慢病毒滴度降低的可能,有的基因在稳定筛选后,其表达还受细胞其他途径调控,可能会不符合预期并对实验中RNA干扰产生影响。经国内外同类研究比较发现,下调Notch信号通路的表达大多采取相对比较简单高效的DAPT,它是一种 $\gamma$ 酶抑制剂,可以间接抑制其底物Notch的活性,进而影响细胞信号传导和细胞分化,成为Notch信号通路的有效阻断剂;此外,对于慢病毒介导基因shRNA干扰骨髓间充质干细胞的研究比较少,一般是对肿瘤细胞进行RNA干扰。该实验优点是基因层次干扰能够靶向阻断信号,对相邻的信号通路干扰较少;缺点是耗时、花费高,选择靶点比较困难,筛选到较高干扰效率的稳转株难度比较大。因此,通过DAPT对Notch信号通路阻断,可能有效解决该问题,并实现对信号通路的相关机制研究。实验得出初步结果,为下游分子信号检测、细胞共培养提供基础,为进一步探究组织工程化心血管网

络生成机制提供前期探索。

**致谢:** 感谢山西医科大学转化医学中心生化实验室于保峰老师、姚志坚师兄、袁洋洋师姐、田九博、李静静、王莹等同学的热情无私帮助,能够掌握细胞培养及鉴定的常规操作,为实验的顺利进行做出很大的贡献。

**作者贡献:** 实验设计、实施为闫锦玉,实验评估为邢万红,资料收集为闫锦玉。

**经费支持:** 该文章接受了“山西省自然科学基金(201601D011094)”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

**利益冲突:** 文章的全部作者声明,在课题研究 and 文章撰写过程中不存在利益冲突。

**机构伦理问题:** 实验方案经山西医科大学动物实验伦理委员会批准,批准号为2018022。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。

**写作指南:** 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

**文章查重:** 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

**文章外审:** 文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

**生物统计学声明:** 文章统计学方法已经通过山西医科大学生物统计学专家审核。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

#### 4 参考文献 References

- [1] Zheng YH, Xiong W, Su K, et al. Multilineage differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells in vitro and in vivo. *Exp Ther Med*. 2013;5(6):1576-1580.
- [2] Wang K, Ding R, Ha Y, et al. Hypoxia-stressed cardiomyocytes promote early cardiac differentiation of cardiac stem cells through HIF-1 $\alpha$ /Jagged1/Notch1 signaling. *Acta Pharm Sin B*. 2018;8(5):795-804.
- [3] Chen XQ, Chen LL, Fan L, et al. Stem cells with FGF4-bFGF fused gene enhances the expression of bFGF and improves myocardial repair in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;447(1):145-151.
- [4] Boopathy AV, Pendergrass KD, Che PL, et al. Oxidative stress-induced Notch1 signaling promotes cardiogenic gene expression in mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 2013;4(2):43.
- [5] Sun X, Altalhi W, Nunes SS. Vascularization strategies of engineered tissues and their application in cardiac regeneration. *Adv Drug Deliv Rev*. 2016;96:183-194.
- [6] Luxán G, Casanova JC, Martínez-Poveda B, et al. Mutations in the NOTCH pathway regulator MIB1 cause left ventricular noncompaction cardiomyopathy. *Nat Med*. 2013;19(2):193-201.
- [7] Poliseti N, Chaitanya VG, Babu PP, et al. Isolation, characterization and differentiation potential of rat bone marrow stromal cells. *Neurol India*. 2010;58(2):201-208.
- [8] 刘艳云. PTH-FC对大鼠骨髓间充质干细胞增殖及骨向分化的影响[D]. 兰州:兰州大学,2018.
- [9] 蒋星海,赵彪,吴凯,等.血管内皮生长因子165、神经营养因子3、血管生成素1基因转染诱导骨髓间充质干细胞向神经元及血管内皮细胞分化[J].中国组织工程研究, 2018,22(25):3956-3962.
- [10] Li J, Chen SY, Zhao XY, et al. Rat Limbal Niche Cells Prevent Epithelial Stem/Progenitor Cells From Differentiation and Proliferation by Inhibiting Notch Signaling Pathway In Vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2017;58(7):2968-2976.
- [11] Shi J, Xing W, Yang J, et al. Comparison and Mechanism Research of the Differentiation of Bone Mesenchymal Stem Cells Into Cardiomyocytes Induced by 5-Azacytidine or Angiotensin II. *J Biomat Tissue Eng*. 2015; 5(5): 364-371.
- [12] James AW. Review of Signaling Pathways Governing MSC Osteogenic and Adipogenic Differentiation. *Scientifica (Cairo)*. 2013;2013:684736.
- [13] 杜红阳,李东宁,付海燕,等. Notch1(NICD)过表达真核载体构建及对大鼠BMSCs增殖分化的影响[J]. 天津医药, 2014,42(9): 883-888.
- [14] Radtke F, Schweisguth F, Pear W. The Notch 'gospel'. *EMBO Rep*. 2005;6(12):1120-1125.
- [15] 张梦迪,路仲达,何易,等.Notch信号通路在骨髓间充质干细胞分化为心肌细胞过程中的作用[J].天津药学,2016,28(1):66-69.
- [16] Novina CD, Sharp PA. The RNAi revolution. *Nature*. 2004; 430(6996):161-164.
- [17] 邓海燕,曾俊义,魏云峰,等.microRNA-1诱导大鼠骨髓间充质干细胞向心肌样细胞分化过程中Notch信号分子的表达变化[J].基础医学与临床,2014,34(9):1204-1210.
- [18] 靳俊杰,安静,曹涤非,等.组蛋白赖氨酸转移酶KAT6B基因shRNA慢病毒载体的构建与鉴定[J].实用肿瘤学杂志, 2018,32(1):1-6.
- [19] 郑介柏,刘旭良,陈文雄,等. DAPT阻断Notch信号通路抑制去势大鼠骨髓间充质干细胞增殖及诱导其成骨分化的作用研究[J].河北医学,2015,21(1):9-12.
- [20] 何佳,邓峰美,林友胜,等.网素蛋白1和增强绿色荧光蛋白基因共表达慢病毒载体构建和鉴定及在结直肠癌细胞SW480中表达[J].中国老年学杂志,2018,38(2):302-305.
- [21] 廖凤玲,陈日玲,姜杉,等. Notch信号通路对VEGF促大鼠间充质干细胞增殖的作用[J]. 中国实验血液学杂志, 2014, 22(4): 1068-1071.
- [22] 张冬,于占革. Notch信号通路与骨髓间充质干细胞分化的研究进展[J].医学综述, 2013, 19(22):4065-4067.
- [23] 任少达. Notch信号通路在骨髓来源的间充质干细胞诱导调节性DC生成中的作用及分子机制的研究[D]. 北京:北京协和医学院, 2015.
- [24] 王继荣,卢艳,岳影星,等. Notch信号在脂多糖诱导的骨髓间充质干细胞中的作用[J].中国病理生理杂志, 2018,34(2):308-313.