

rAAV1-EGFP 和 rAAV2-EGFP 转染犬骨髓间充质干细胞的比较

刘 斌, 蔡道章*, 戎利民, 王 昆, 曾 春, 谢沛根
(中山大学附属第三医院骨科, 广东 广州 510630)

摘要:【目的】研究不同血清型腺相关病毒(rAAV)载体介导的增强绿色荧光蛋白基因(EGFP)对体外培养犬骨髓间充质干细胞(MSC)的转染效率及其毒性作用。【方法】应用密度梯度离心法及贴壁筛选法分离培养犬 MSC, 倒置显微镜及 Giemsa 染色观察细胞形态, 透射电镜观察其超微结构, 流式细胞仪鉴定其表面标记物。取第3代 MSC, 以 MOI 为 $10^4 \sim 10^5$ v.g./cell 的 rAAV1-EGFP 和 rAAV2-EGFP 进行转染, 3、7、21 d 后荧光显微镜观察检测转染效率; MTT 法检测 rAAV1-EGFP 和 rAAV2-EGFP 对 MSC 的毒性作用。【结果】原代及传代培养的 MSC 呈梭形外观, 具有较强的增殖能力。MSC 超微结构显示其胞体较小, 细胞核/浆比例大, 胞浆少, 染色质较疏松。细胞表面抗原 CD29、CD44 表达阳性, CD34 表达阴性。随 MOI 的增加及时间的延长, rAAV1-EGFP、rAAV2-EGFP 对犬 MSC 的转染效率逐渐增加, rAAV2-EGFP 转染效率明显高于 rAAV1-EGFP ($P < 0.01$)。转染 MSC 细胞后, 细胞生长正常, MTT 法显示各转染组与未转染组的光密度值无统计学差异 ($P > 0.05$)。【结论】相对犬 MSC, rAAV2 是一种比 rAAV1 更优越的转基因载体, 而且对细胞生长无明显抑制, 作为组织工程种子细胞的载体是安全可行的。

关键词: 骨髓间充质干细胞; 腺相关病毒; 增强绿色荧光蛋白; 组织工程; 犬

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-3554(2009)06-0717-06

Comparison of Transfection Effect between rAAV1-EGFP and rAAV2-EGFP into Canine Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells

LIU Bin, CAI Dao-zhang*, RONG Li-min, WANG Kun, ZENG Chun, XIE Pei-gen
(Department of Orthopaedics, The Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou.510630, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the influence of enhanced green fluorescent protein gene mediated by recombinant adeno-associated virus vector with different serotypes on the transfection efficiency and cytotoxicity to canine bone marrow mesenchymal stem cells in vitro. 【Methods】 The MSC from canine bone marrow were isolated and cultured in vitro by density gradient centrifugation and adherence screening method. The morphology of MSC was observed by inverted phase contrast microscope and Giemsa stain. The ultrastructure of MSC was observed by transmission electron microscope. The flow cytometry was used to detect surface antigens of MSC. The third passage of MSC were transfected with rAAV1-EGFP and rAAV2-EGFP at the MOI of $10^4 \sim 10^5$ v.g./cell. After 3, 7, and 21 days, the transfection efficiency was detected by the fluorescence microscope. MTT was performed to detect the cytotoxicity of rAAV1-EGFP and rAAV2-EGFP on MSC. 【Results】 The MSC appeared morphologically as spindle-shaped and showed active proliferative capacity in primary and passage cultures. It showed that the ratio of cellular nucleus and cytoplasm was high and chromatin was loosened with TEM. Flow cytometry analysis indicated that MSC were universally positive for CD29 and CD44, but negative for CD34. With the increase of MOI and the extension of time, the transfection efficiency of rAAV2-EGFP enhanced, which was higher than that of rAAV1-EGFP into MSC ($P < 0.01$). After transfection, the growth of MSC was normal. MTT detection showed that there was no significant difference of the value of OD in MSC between transgenic and no transgenic group ($P > 0.05$). 【Conclusion】 rAAV2 is a better vector of gene transfection into

收稿日期: 2009-04-05

基金项目: 广东省科技计划项目(2007B031001004; 2005B34001003); 中山大学青年教师基金(3171911)

作者简介: 刘斌, 医学博士, 主治医师, E-mail: johnliu2001@sina.com; * 通信作者, 蔡道章, 教授, 博士生导师, E-mail: dao Zhang@medmail.com.cn

canine MSC than that of rAAV1. rAAV2 has no inhibition effect on the MSC's growth, therefore, it is a safe and feasible vector for the seed cells of tissue engineering.

Key words: mesenchymal stem cells; adeno-associated virus; enhanced green fluorescent protein; tissue engineering; canine

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2009, 30(6): 717-722]

骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)具有多向分化的潜能,可将其在体外培养、增殖、诱导后分化为成骨细胞、软骨细胞、神经细胞、心肌细胞等,是目前组织工程的种子细胞之一^[1-3]。腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)载体是目前已知的可以整合在染色体上长期表达而不致病的病毒载体,但 AAV 载体对不同的细胞转染效率存在差异;而且对于同一种细胞,不同血清型的 AAV 载体转染效率也不尽相同^[4-6]。目前, AAV 载体对 MSC 的转染情况少有报道,对于不同血清型 AAV 载体对犬 MSC 的转染效率的比较则未见报道。为明确 AAV1 与 AAV2 载体对 MSC 的转染特点和表达效率,我们就 AAV 载体介导的报告基因增强绿色荧光蛋白基因 (enhanced green fluorescent protein, EGFP) 对体外培养犬 MSC 的转染情况进行了观察。

1 材料和方法

1.1 犬 MSC 的分离培养与鉴定

1.1.1 犬 MSC 的分离和培养 30 g/L 戊巴比妥钠静脉麻醉后骨穿针行髂后上棘穿刺,抽取骨髓组织约 5 mL, 1 000 r/min ($r = 15$ cm) 离心 7 min, 去脂肪及上清液, *l*-DMEM 重悬细胞,沿管壁缓慢滴加底部有等量 Percoll (1.073 g/mL) 分离液的离心管中, 2 000 r/min ($r = 15$ cm) 离心 15 min, 吸取中间界面白膜层,用 *l*-DMEM 洗涤, 1 200 r/min ($r = 15$ cm) 离心 5 min, 弃上清, 重复 1 次, 加入 *l*-DMEM 完全培养基(含体积分数 10% FBS, 青霉素钠 100 U/mL、链霉素 100 U/mL), 以 4×10^4 /cm² 接种于 T-25 培养瓶, 置于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 和饱和湿度的孵箱内培养。48 h 后换液, 去除未贴壁细胞, 以后每 3 d 换液一次。相差显微镜观察照相细胞形态和生长情况, 待细胞达到 80% ~ 90% 融合时, 用 2.5 g/L 胰酶(含 0.2 g/L EDTA) 消化传代培养。

1.1.2 Giemsa 染色观察细胞形态 将第 3 代细胞 MSC 于内置有消毒盖玻片的六孔板内制备细胞爬片。用甲醇与冰醋酸(体积比 3:1) 固定 5 min, 干

燥后加 Giemsa 染液染色 15 min, 冲洗、干燥, 中性树脂封片。

1.1.3 透射电镜观察 收集第 3 代 MSC, 25 g/L 冷戊二醛固定后, PBS 洗涤, 10 g/L 锇酸后固定, 梯度丙酮脱水, 常规包埋、超薄切片, 20 g/L 醋酸铀和枸橼酸铅染色, 在透射电镜下观察其超微结构。

1.1.4 MSC 表面抗原的流式细胞仪检测 取培养的第 3 代 MSC, 弃去培养液, 加入 2.5 g/L 胰蛋白酶消化细胞, 用含体积分数 10% FBS 的 *l*-DMEM 终止消化, 吹打、离心收集细胞, 用 0.01 mol/L PBS 漂洗 2 次。分别取 1×10^6 /mL 密度的细胞悬液 50 μ L 与抗 CD29-PE、CD34-PE、CD44-FITC 抗体 10 μ L 在室温下避光孵育 20 min。0.01 mol/L PBS 洗涤 2 次后, 将洗涤后的细胞离心后重悬于 0.5 mL PBS 中, 应用流式细胞仪检测分析。

1.2 rAAV-EGFP 转染犬 MSC

1.2.1 rAAV1-EGFP 和 rAAV2-EGFP 转染 MSC 取第 4 代 MSC, 2.5 g/L 的胰酶消化后, 应用含体积分数 10% FBS 的 *l*-DMEM 液终止消化, 吹打后离心, 将细胞以 2×10^4 个/孔接种于 2 块 12 孔培养板, 37 °C 孵育过夜, 以无血清 DMEM 液漂洗细胞两次, 按感染复数(MOI)值(病毒基因数, v.g./cell) 为 2×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 将无血清 DMEM 培养基与 rAAV1-EGFP、rAAV2-EGFP 混合液约 400 μ L 加入每孔细胞中, 及时混匀。以不进行病毒转染的 MSC (MOI = 0) 作为对照组, 每组设复孔 6 孔。在 37 °C、体积分数 5% CO₂ 条件下孵育 2 h, 弃去培养液, 更换新鲜的完全培养基继续在体外进行培养, 以后每 2 d 更换 1 次培养基。分别于 3、7、21 d 后在荧光显微镜下观察拍照计数绿色荧光细胞, 计算转染效率。每孔通过观察 3 个高倍视野, 采用双盲法计数每 100 个细胞中的阳性细胞数, 取平均值即为其细胞转染率。

1.2.2 MTT 法检测细胞毒性 取第 4 代 MSC, 细胞悬液浓度调至 1.0×10^5 个/孔, 接种于 96 孔板中, 37 °C 孵育过夜, DMEM 漂洗两次, 按上述 MOI 值将无血清 DMEM 培养基与 rAAV1-EGFP、rAAV2-EGFP 混合液约 30 μ L 加入每孔细胞中, 以不进行病毒转染的 MSC 为对照组, 每组设复孔

6孔,共分7组。于37℃培养箱孵育3 d、7 d,弃培养液,每孔加入完全培养基200 μL,MTT液(5 mg/mL)20 μL,37℃孵育4 h,弃上清加入DMSO 200 μL,振荡溶解15 min,于酶标仪上测定490 nm处的光密度 $D(490\text{ nm})$ 值。

1.3 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 10.0软件包进行统计学分析,样本均数间比较使用析因设计及单因素方差分析, $P < 0.05$ 认为具有统计学意义。

2 结果

2.1 MSC形态观察

48 h更换培养液时,可见散在分布的贴壁细胞,呈梭形,有胞浆突起,少部分呈多角形。第5天见原来的单个细胞或细胞集落形成多个细胞克隆,细胞呈成纤维细胞样,呈平行排列或漩涡状生长。第10~12天细胞克隆扩大直至铺满培养瓶底面(图1)。传代培养后的细胞不再以集落方式生长,而呈均匀性分布生长,且生长迅速,约6~8 d即可铺满全层;第15代以后,形态变平坦、宽大,分裂相减少,细胞质疏松,可见空泡,细胞老化,增殖明显变慢。Giemsa染色示第3代犬MSC呈条索状,有长的突足,细胞核较大,核仁明显(图2A)。

2.2 MSC超微结构特点

透射电镜观察可见,第3代MSC胞体较小,细胞核/浆比例大,胞核呈圆形或椭圆形,核仁明显,胞浆少,染色质较疏松,胞浆中线粒体、内质网等细胞器少,表现出早期细胞的特点(图2B)。

2.3 MSC表面抗原检测

取第3代MSC进行流式细胞仪检测显示,CD29(95.63%)、CD44(97.89%)表达阳性,而CD34(0.41%)表达阴性(图3)。

2.4 rAAV-EGFP对体外培养MSC的转染率

荧光显微镜观察示,转染3 d后,rAAV1-EGFP(MOI = 2×10^4)组未观察到MSC表达EGFP荧光;随着MOI的增加,rAAV1-EGFP(MOI = 1×10^5)组及rAAV1-EGFP(MOI = 5×10^5)组个别细胞表达EGFP,但表达EGFP荧光较弱,其转染率分别为(1.2 ± 0.4)%、(4.3 ± 1.4)%。rAAV2-EGFP各组细胞均有表达EGFP,并且随MOI增加,其表达量及表达荧光强度均增强,rAAV2-EGFP(MOI = 5×10^5)组转染率已达(20.3 ± 2.4)%,明显高于

rAAV1-EGFP(MOI = 5×10^5)组($P < 0.01$)。转染7 d后,各组细胞均表达EGFP,其中rAAV1-EGFP(MOI = 2×10^4)组及rAAV1-EGFP(MOI = 1×10^5)组表达量仍然很低,而rAAV1-EGFP(MOI = 5×10^5)组其转染率达到了(11.8 ± 2.2)%;而rAAV2-EGFP各组细胞此时表达EGFP量明显增加,随MOI增加其转染率分别为(20.1 ± 3.1)%、(43.8 ± 3.4)%、(64.0 ± 5.6)%,明显高于相应MOI的rAAV1各组细胞(P 皆 < 0.05 ;图4)。连续观察发现随着时间延长,各组EGFP阳性细胞逐渐增多,荧光亮度增强,但增速较慢。到21 d后,表达EGFP荧光的细胞数量及亮度不再有明显变化。各组rAAV-EGFP转染MSC的转染率见表1。

2.5 细胞毒性实验

转染3 d及7 d后各组细胞与对照组相比,各组 $D(490\text{ nm})$ 值差异无统计学意义($P = 0.371, P = 0.471$,表2)。

表1 不同血清型rAAV-EGFP转染MSC的转染率
Table 1 Transfection efficiency of MSC with different serotypes of rAAV-EGFP (% , $\bar{x} \pm s, n = 6$)

Group	3 d	7 d	21 d
rAAV1-EGFP			
MOI = 2×10^4	—	2.3 ± 0.9	3.9 ± 0.8
MOI = 1×10^5	1.2 ± 0.4	5.3 ± 1.6	8.7 ± 2.3
MOI = 5×10^5	4.3 ± 1.4	11.8 ± 2.2	15.9 ± 2.5
rAAV2-EGFP			
MOI = 2×10^4	5.6 ± 0.9	20.1 ± 3.1	28.8 ± 2.4
MOI = 1×10^5	10.6 ± 1.6	43.8 ± 3.4	55.3 ± 4.7
MOI = 5×10^5	20.3 ± 2.4	64.0 ± 5.6	74.8 ± 4.9

表2 不同血清型rAAV-EGFP转染MSC的 $D(490\text{ nm})$ 值
Table 2 $D(490\text{ nm})$ of transfected MSC with different serotypes of rAAV-EGFP ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Group	3 d	7 d
rAAV1-EGFP		
MOI = 2×10^4	$0.072 \pm 0.009^{1)}$	$0.226 \pm 0.029^{2)}$
MOI = 1×10^5	$0.080 \pm 0.009^{1)}$	$0.205 \pm 0.031^{2)}$
MOI = 5×10^5	$0.074 \pm 0.011^{1)}$	$0.226 \pm 0.025^{2)}$
rAAV2-EGFP		
MOI = 2×10^4	$0.073 \pm 0.010^{1)}$	$0.238 \pm 0.036^{2)}$
MOI = 1×10^5	$0.082 \pm 0.009^{1)}$	$0.209 \pm 0.032^{2)}$
MOI = 5×10^5	$0.075 \pm 0.011^{1)}$	$0.216 \pm 0.021^{2)}$
Control	0.080 ± 0.008	0.221 ± 0.021

1) compared with control group, $P > 0.05$; 2) compared with control group, $P > 0.05$

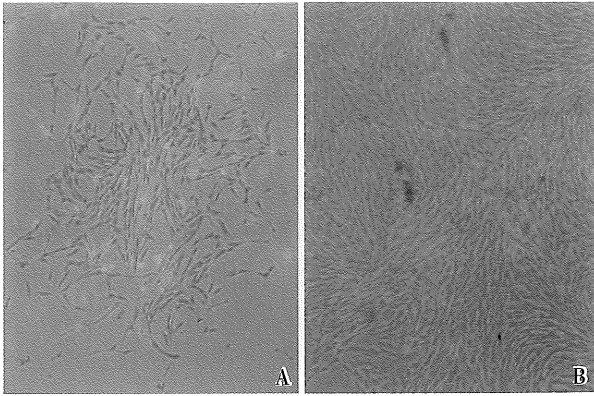


图 1 犬原代 MSC 培养

Fig.1 Cultured primary canine MSC

A: 5 d; B: 10 or 12 d; phase contrast microscope, × 40

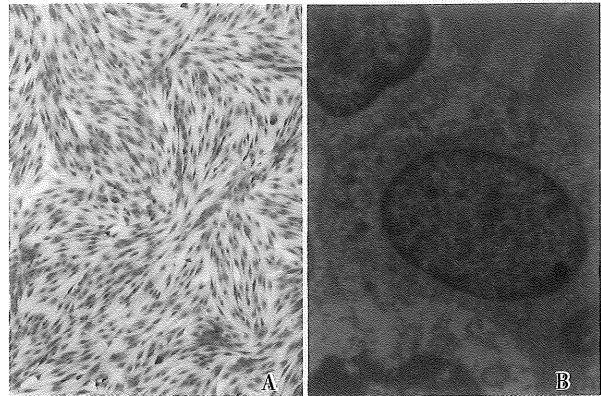


图 2 犬 MSC 传代培养细胞形态及超微结构

Fig.2 Morphology of passaged canine MSC

A: Giemsa, × 40; B: TEM, × 15 000

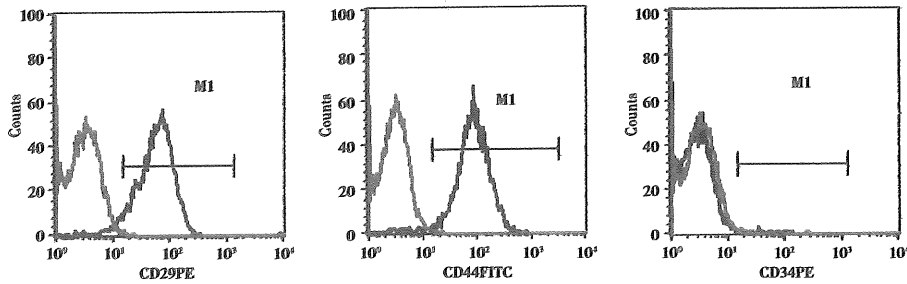


图 3 第 3 代犬 MSC 流式细胞仪检测表面抗原

Fig.3 Surface antigens of passaged canine MSC by flow cytometry

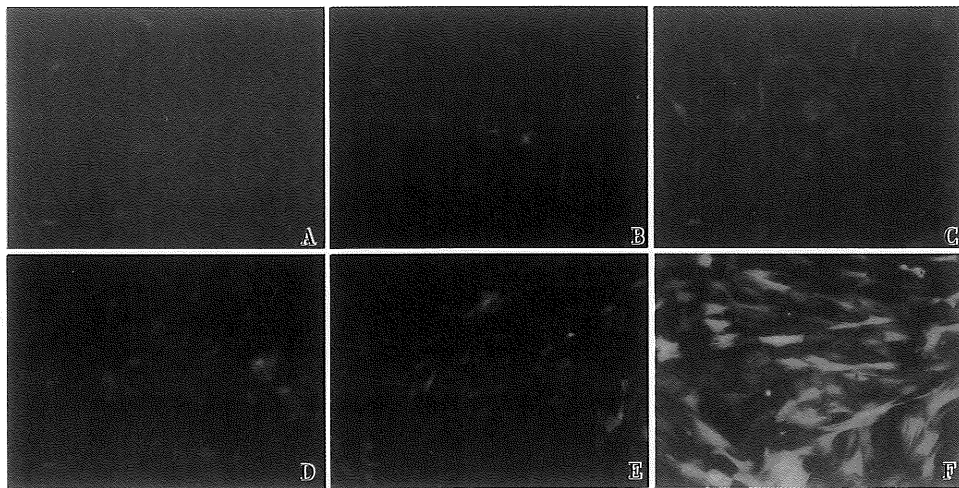


图 4 rAAV1-EGFP、rAAV2-EGFP 转染 MSC 荧光显微镜

Fig.4 The MSC were transfected with rAAV1-EGFP and rAAV2-EGFP on 7 d

A: rAAV1-EGFP (MOI = 2 × 10⁴); B: rAAV1-EGFP (MOI = 1 × 10⁵); C: rAAV1-EGFP (MOI = 5 × 10⁵); D: rAAV2-EGFP (MOI = 2 × 10⁴); E: rAAV2-EGFP (MOI = 1 × 10⁵); F: rAAV2-EGFP (MOI = 5 × 10⁵); fluorescent microscope × 100

3 讨论

3.1 MSC 的鉴定

目前没有一个特征性的分子能特异性地对

MSC 进行鉴定。比较一致的标准是：①形态学鉴定, MSC 呈梭形外观, 贴壁生长; ②选取有代表性的、尤其区别容易混杂细胞的表型分子抗体做流式细胞术表型鉴定, 结果符合 MSC 特征; ③ MSC 具有体外诱导分化为已知细胞的能力。

研究结果显示, MSC 光镜下形态和 Giemsa 染色均与成纤维细胞相似, 主要为梭形。然而超微结构显示 MSC 细胞核/浆比例大, 显示了干细胞的幼稚特性, 与成纤维细胞和血细胞等明显不同。而 MSC 的这种低分化状态构成了其强大的自我复制和能够向多种组织分化的基础。

鉴定 MSC 表型的表面标志很多, 一般认为 MSC 表达 SH2、SH3、CD29、CD44、CD71、CD90、CD92、D106、CD120a、CD124 和 CD166 等表面蛋白^[7-8], 而不表达 CD34、CD38、CD45、CD11a 和 CD14 等。实验结果表明, CD44 的阳性表达为 97.89%, CD29 阳性表达为 95.63%, 而 CD34 仅为 0.41%。因此, 可以认为所获得的细胞是较为均一的 MSC。

3.2 不同血清型 AAV 对 MSC 的作用

AAV 载体是最近发展起来的一类新型基因载体, 作为病毒载体的一分子, 与其他病毒载体相比, 具备如下特性: 人群感染率高(80%~90%), 但无致病性, 且免疫反应轻微; 可定点整合, 并能以较稳定的形式存在; 宿主范围广泛, 包括分裂期和非分裂期的多种细胞; 携带的外源基因长期持续稳定表达, 并可调控; 具有较好的热稳定性和抗酸碱性以及抗有机溶剂处理的特点, 便于储存^[9-10]。因而其在基因治疗中的应用潜力引起了人们极大兴趣。

AAV 属细小病毒科家族成员, 其颗粒直径 18~26 nm, 结构简单无包膜, 仅由核衣壳和一条单链 DNA 构成。国际病毒分类委员会根据衣壳的差异已鉴别出多个 AAV 种类成员, 包括 AAV 1~AAV-11 等^[11-12]。不同 AAV 血清型具有不同的衣壳构象, 因而其识别与结合的细胞表面受体或共受体也相应存在差异^[13]。

形态结构的差异和细胞趋向性的不同导致不同血清型转染的细胞类型和感染效率也各不相同。AAV-1 和 AAV-7 在骨骼肌中的转染效率较高^[14-15], AAV-3 在巨核细胞的转染具有优势^[16], AAV-5 和 AAV-6 感染气道顶侧细胞更加高效^[4-5], AAV-8 可将基因高效地靶向传递至骨骼肌和心肌^[6], AAV-2、AAV-4 和 AAV-5 均可转导中枢神经系统的细胞, 但在感染途径和靶细胞类型上存在差异^[17]。

AAV 对不同动物 MSC 的转染效率也不同。McMahon 等^[18]证实 AAV 对大鼠 MSC 转染率极低, 即使增加病毒滴度也不会增强转染效率; 而对兔

MSC 则有较高的转染率。Chng 等^[19]对狒狒及人 MSC 研究发现, AAV 对狒狒的转染率明显较人的高, 不同血清型的 AAV 对同种 MSC 的转染效率也不一样: AAV2 > AAV5 > AAV3 > AAV1、AAV4、AAV6、AAV8。McMahon^[18]等通过五种不同血清型 AAV1~AAV5 对兔 MSC 转染后发现, AAV2 的转染效率最高, 依次是 AAV2 > AAV5 > AAV1 > AAV3、AAV4。

本研究结果显示, rAAV2-EGFP 各组 MSC 中均有表达 EGFP, 并且随 MOI 增加, 其表达量及表达荧光强度均增强, 到 21 d 后, 表达 EGFP 荧光的细胞数量及亮度不再有明显变化。rAAV-EGFP 各组 MSC 中 EGFP 的表达明显低于 rAAV2 各组, 即 rAAV2 对犬 MSC 的转染效率明显高于 rAAV1, 这与 McMahon 等^[18]和 Chng 等^[19]的研究结果一致, 其原因可能为不同 AAV 衣壳蛋白结构决定簇不同, 导致它们同靶细胞表面不同的受体结合, 故对细胞的亲嗜性不同。本实验中 rAAV2 对犬 MSC 的转染率明显高于兔及人 MSC, 推测可能与转染病毒的滴度不同及 AAV 与不同靶细胞表面受体亲和力不同有关, 因而对各种宿主 MSC 的亲嗜性存在差异。

本实验还证实, AAV 转染 MSC 后, EGFP 早期表达量较低, 随时间延长, EGFP 表达率增加较快, 推测其原因可能由于 AAV 是单链 DNA, 病毒进入细胞后, 要变成双链 DNA 才能进行转录和表达蛋白。这一过程还包括病毒颗粒转运到细胞核内, 脱衣壳, 正负链退火或单链复制成双链等, 因此比较缓慢。有人也把这种第一链合成的过程称为腺相关病毒重组体转染的限速过程。这个过程可以是数天、数星期甚至是数月, 这与腺相关病毒重组体转染的宿主细胞及所处的转染环境有关。

通过对 3 种不同 MOI 值的 AAV 转染 MSC 的测定, 发现较高滴度 AAV 的转染效率高, 然而有研究显示, 也不是 MOI 值越高越好, 当 MOI 值大于 10^7 时, 外源基因的表达水平反而会明显下降, 甚至几乎检测不到表达。其机理尚不清楚, 推测可能与 AAV 病毒具有多个细胞受体有关。本实验结果显示 MOI 为 5×10^5 v.g./cell 较为适宜。

通过细胞毒性试验发现, 转染 3 d 及 7 d 后各组细胞与对照组相比, $D(490 \text{ nm})$ 无明显差异, 说明 AAV 载体是一种安全、无毒性基因载体。其他研究也证实了这一特点, 重组 AAV 无致畸性, 不能诱发恶性肿瘤^[20]。

综上所述,rAAV2 相对犬 MSC,其转染效率明显高于 rAAV1,可长期稳定表达 EGFP,并且对细胞无毒性作用,可作为组织工程种子细胞的理想病毒基因载体。

参考文献:

- [1] Kondaiah P. Bone marrow stromal cells and multilineage differentiation [J]. *J Biosci*, 2003, 28 (6): 651-654.
- [2] 王亚柱,邓宇斌,甘丹卉,等. 大鼠骨髓间质干细胞定向分化为神经元的实验研究 [J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2008, 29(4): 383-387,392.
- [3] 韦育林,伍卫,王景峰,等. 骨髓间充质干细胞诱导分化为心肌细胞及其内向整流钾电流特征 [J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2005, 26(4): 396-399.
- [4] Zabner J, Seiler M, Walters R, et al. Adeno-associated virus type 5 (AAV5) but not AAV2 binds to the apical surfaces of airway epithelia and facilitates gene transfer [J]. *J Virol*, 2000, 74(8): 3852-3858.
- [5] Halbert CL, Allen JM, Miller AD. Adeno-associated virus type 6 (AAV6) vectors mediate efficient transduction of airway epithelial cells in mouse lungs compared to that of AAV2 vectors [J]. *J Virol*, 2001, 75(44): 6615-6624.
- [6] Wang Z, Zhu T, Qiao C, et al. Adeno-associated virus serotype 8 efficiently delivers genes to muscle and heart [J]. *Nat Biotechnol*, 2005, 23(3): 321-328.
- [7] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells [J]. *Science*, 1999, 284(5411): 143-147.
- [8] 王忠,高毅,汪艳,等. 人骨髓间充质干细胞的分离培养与鉴定 [J]. *中华神经医学杂志*, 2006, 5 (10): 973-977.
- [9] Arruda VR, Stedman HH, Nichols TC, et al. Regional intravascular delivery of AAV-2-F.IX to skeletal muscle achieves long-term correction of hemophilia B in a large animal model [J]. *Blood*, 2005, 105(9): 3458-3464.
- [10] Carter PJ, Samulski RJ. Adeno-associated viral vectors as gene delivery vehicles [J]. *Int J Mol Med*, 2000, 6 (1): 17-27.
- [11] Gao G, Vandenberghe LH, Wilson JM. New recombinant serotypes of AAV vectors [J]. *Curr Gene Ther*, 2005, 5(3): 285-297.
- [12] Mori S, Wang L, Takeuchi T, et al. Two novel adeno-associated viruses from cynomolgus monkey: pseudotyping characterization of capsid protein [J]. *Virology*, 2004, 330(2): 375-383.
- [13] Ding W, Zhang L, Yan Z, et al. Intracellular trafficking of adeno-associated viral vectors [J]. *Gene Ther*, 2005, 12 (11): 873-880.
- [14] Xiao W, Chirmule N, Berta SC, et al. Gene therapy vectors based on adeno-associated virus type 1 [J]. *J Virol*, 1999, 73(5): 3994-4003.
- [15] Chao H, Liu Y, Rabinowitz J, et al. Several log increase in therapeutic transgene delivery by distinct adeno-associated viral serotype vectors [J]. *Mol Ther*, 2000, 2(6): 619-623.
- [16] Handa A, Muramatsu S, Qiu J, et al. Adeno-associated virus (AAV)-3-based vectors transduce haematopoietic cells not susceptible to transduction with AAV-2-based vectors [J]. *J Gen Virol*, 2000, 81(Pt 8): 2077-2084.
- [17] Davidson BL, Stein CS, Heth JA, et al. Recombinant adeno-associated virus type 2, 4, and 5 vectors transduction of variant cell types and regions in the mammalian central nervous system [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(7): 3428-3432.
- [18] McMahon JM, Conroy S, Lyons M, et al. Gene transfer into rat mesenchymal stem cells: a comparative study of viral and nonviral vectors [J]. *Stem Cells Dev*, 2006, 15(1): 87-96.
- [19] Chng K, Larsen SR, Zhou S, et al. Specific adeno-associated virus serotypes facilitate efficient gene transfer into human and non-human primate mesenchymal stromal cells [J]. *J Gene Med*, 2007, 9(1): 22-32.
- [20] Bell P, Wang L, Leberherz C, et al. No evidence for tumorigenesis of AAV vectors in a large-scale study in mice [J]. *Mol Ther*, 2005, 12(2): 299-306.

(编辑 徐杰)