

梅花鹿 Thymosin beta 10 基因 RNAi 慢病毒载体的构建及其对鹿茸干细胞增殖的影响^{*}

张 伟,褚文辉,路 晓,董 振,王权威,李春义^{**}

中国农业科学院特产研究所,特种经济动物分子生物学省部共建国家重点实验室,长春 130112

摘 要: 利用慢病毒干扰系统,对梅花鹿生茸区骨膜干细胞(Antlerogenic periosteum cells, AP 细胞) Thymosin beta 10(T β 10) 基因进行 RNA 干扰(RNA Interference, RNAi),并初步研究该基因对细胞增殖的影响。结果表明:试验设计的 3 条针对梅花鹿 T β 10 基因的 shRNA 序列与载体质粒 pLVTHM 连接成功,与 pSPAX2、pMD2. G 质粒共转染 HEK 293T 细胞,获得的重组慢病毒成功感染了 AP 细胞;荧光定量 PCR 检测结果表明, RNA 干扰后 T β 10 基因的 mRNA 水平下调,MTT 试验结果显示 T β 10 基因的下调可以抑制 AP 细胞增殖。试验成功构建了针对梅花鹿 T β 10 基因 RNAi 载体,并成功干扰了 T β 10 基因在 AP 细胞中的表达,基因下调最高可达 35.6%,并初步确定 T β 10 基因下调可抑制 AP 细胞的增殖。

关键词: 鹿茸; Thymosin beta 10(T β 10); RNA 干扰; 增殖

中图分类号: S825 文献标识码: A 文章编号: 1000-5684(2016)01-0092-05

DOI: 10.13327/j.jlau.2015.2626

引文格式: 张伟,褚文辉,路晓,等.梅花鹿 Thymosin beta 10 基因 RNAi 慢病毒载体的构建及其对鹿茸干细胞增殖的影响[J].吉林农业大学学报,2016,38(1):92-96,106.

Construction of RNAi Lentiviral Vector for Thymosin beta 10 and Effects of Its Introduction on Proliferation of Antler Stem Cells in Sika Deer

ZHANG Wei, CHU Wenhui, LU Xiao, DONG Zhen, WANG Quanwei, LI Chunyi^{**}

State Key Laboratory for Molecular Biology of Special Economic Animals, Institute of Special Animal and Plant Sciences of CAAS, Changchun 130112, China

Abstract: Thymosin beta 10 (T β 10) gene of antlerogenic periosteum cells of Chinese sika deer was interfered by using RNAi lentiviral vector system, and effects of the system introduction on proliferation of antler stem cells were primarily studied. The results showed that: (1) Three sequences of small interfering RNAs, targeting T β 10 gene of sika deer, were successfully ligated into the lentiviral plasmids (pLVTHM); (2) AP cells were successfully infected by recombinant lentivirus, which was obtained by each plasmid co-transfection into HEK 293t cells, together with the plasmids pSPAX2 and pMD2. G; (3) The expression level of T β 10 mRNA in the infected AP cells was significantly decreased through RT-PCR measurement, and the interference of T β 10 played a role in the

基金项目:“十二五”国家高技术研究发展计划(863)项目(2011AA100603),国家自然科学基金项目(31170950),中国农业科学院特产研究所创新工程专项经费

作者简介:张伟,男,在读硕士,研究方向:鹿茸生物学;褚文辉,男,助理研究员,研究方向:鹿茸生物反应器。

褚文辉与张伟同为第一作者。

收稿日期:2015-04-15

通讯作者

suppression of proliferation of AP cells through MTT assay. Therefore, in this study we successfully interfered T β 10 gene in the AP cells with the efficiency of 35.6% compared to the control, and obtained preliminary results for the role of T β 10 in AP cells.

Key words: deer antler; Thymosin beta 10(T β 10); RNAi; proliferation

Thymosin beta 10(T β 10) 是 Thymosin beta 家族的主要一员, 是一类肌动蛋白结合因子, 已知 T β 10 参与调控细胞增殖、细胞凋亡及细胞迁移等在内的多种细胞活动。同时, 有研究报道 T β 10 参与调控血管形成、炎症发生以及早期器官发育等过程^[1-2]。值得注意的是, 该因子在肿瘤发生以及肿瘤恶化过程中均高度表达, 且与部分肿瘤的恶化分级具有相关性, 是肿瘤发生及恶化的一个重要预判指标, 同时也是现今兴起的一个治疗肿瘤的靶向位点^[3-4]。但是, 目前对 T β 10 的研究比较分散并且缺乏系统性, 因此亟需一个能够全面研究该因子的新型研究模型。中国农业科学院特产研究所特种经济动物干细胞创新团队前期研究结果发现, T β 10 在鹿茸组织中存在高度差异表达, 因此鹿茸有望成为一个研究 T β 10 的新模型。

鹿茸是哺乳动物器官中唯一后天发育的并可完全再生的特例, 它是包括血管、皮肤、神经、软骨及骨在内的多种组织形成的器官。由于其能够周期性再生, 因而可以用于多种生物医学研究, 如再生生物学、干细胞生物学、肿瘤生物学等^[5-6]。鹿茸在生茸期生长非常迅速, 最快时每天能达到 1~2 cm, 在其过程中鹿茸保持着旺盛的细胞增殖并伴随着高水平的细胞凋亡, 同时鹿茸中血管组织也快速生长。鹿茸的这些特性与肿瘤某些特性高度相关, 但是鹿茸却不会发生癌变。研究发现, 鹿茸的发生起源于生茸区骨膜(AP), 其中包含了约 330 万个细胞, 这些细胞具有干细胞的特性, 能分化成多种成体细胞并表达 Nanog、OCT4 等多种胚胎干细胞标记物^[7-9]。前期研究发现, T β 10 特异性表达于鹿茸组织的血管壁上并高度富集。因此, 推测其与鹿茸的血管新生及侵入相关, 从而保证鹿茸的快速生长。

本试验利用慢病毒介导的 RNAi 途径^[10], 靶向沉默 AP 细胞 T β 10 基因, 并进一步探究 T β 10 的 RNAi 对 AP 细胞增殖的影响, 为下一步研究 T β 10 在鹿茸以及其他模式动物中的功能作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

AP 细胞、感受态细胞 DH5 α 、细胞株人胚肾细胞 293T、载体质粒 pLVTHM、包膜质粒 pMD 2. G、包装质粒 pSPAX2 均由中国农业科学院特产研究所特种经济动物分子生物学国家重点实验室保藏。限制性内切酶 *Cla* I、*Mlu* I (NEB, 中国), T₄ DNA 连接酶 (Takara, 日本), 小量质粒提取试剂盒 (Transgen, 中国), 大量质粒 DNA 提取试剂盒 (Promega, 美国), 琼脂糖凝胶回收试剂盒 (E. Z. N. A, 美国), 100 bp DNA Marker (Takara, 日本), DMEM、Trypsin (life tech, 美国), 标准胎牛血清 (Clack, 澳大利亚), X-treme GENE HP (Roche, 瑞士), ploybrene (Millipore, 美国), 其他试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 方法

1.2.1 梅花鹿 T β 10 shRNA 的重组慢病毒载体的构建及鉴定 根据中国农业科学院特产研究所特种经济动物干细胞创新团队 cDNA 文库中的基因序列, 及一定的筛选法则选择了 3 条针对梅花鹿 T β 10 基因的高分 RNAi 靶序列, 并将筛选的 RNAi 靶序列在 NCBI 中进行序列同源性比对, 以确保 RNAi 序列不会脱靶。在筛选好的 RNAi 序列两端加上酶切位点、内成环结构、终止信号等, 送上海生工合成。设计 3 对 shRNA 序列(下划线部分为内切酶及终止信号, 方框部分为内成环结构):

T1: cgcgtccccc-TTCATTAATCATACAAATA
ATTT ttcaagaga AAATTATTTGATTAATGAA-tttttg
gaaat; T2: cgcgtccccc-GCCTTATCGAAGCTGTTGATT
TC ttcaagaga AAATCAACAGCTTCGATAAGGC-ttt
ttggaaat; T3: cgcgtccccc-ACAATTCGAGAAGTTCCG
CT tcaagaga GCGGAACCTTCTCGAATTG-tttttggaa
at; Tc: cgcgtccccc-ACCTGCTTACATACGTGAA
ttcaagaga TTCACGTATGTAAGCAGGT-tttttg gaaat。

Tc 为无意义链, 作为阴性对照。合成的序列

经退火形成双链 Oligo DNA, 与经过 *Cla* I、*Mlu* I 双酶切后形成的 pLVTHM 载体连接, 转化 DH5 α 大肠杆菌扩增。挑选重组阳性克隆菌株, 利用小提试剂盒小量提取质粒后, 按如下引物进行 PCR 鉴定: 5'-ctggg aaatcaccataaacg-3'; 5'-ttat tcccatg cgacgg tat-3'。

对 PCR 鉴定阳性的质粒进行测序鉴定(上海生工生物工程有限公司)。测序正确后利用 Pro-mega 大量质粒提取试剂盒大量制备, 同时对 pS-PAX2 和 pMD2. G 进行大提以备后用。

1.2.2 重组慢病毒包装 利用 0.8% 胰酶消化 293T 细胞并计数, 接种于 10 cm 细胞皿中, 添加 10 mL DMEM [含 10% 标准胎牛血清(FBS) 不含抗生素], 使 293T 细胞在转染日融合度 > 80%。使用 1.5 mL opti-MEM 稀释 13.5 μ g DNA [m (pLVTHM): m (Pspax2): m (pMD2. G) = 3.0: 4.5: 6.0], 同时添加 22 μ L X-treme GENE HP 转染试剂后, 在室温下孵育 25 min 后, 将复合物加到细胞培养皿中, 轻轻摇动培养皿以混匀。37 $^{\circ}$ C 5% 的 CO $_2$ 孵育 12 h, 然后更换完全培养基。24 h 后倒置荧光显微镜下, 检测荧光蛋白 GFP 的表达情况以确定转染效率。转染后 24 h 收集细胞培养皿中上清于 50 mL 离心管中。1 000 g 离心 5 min, 弃去细胞碎片沉淀, 然后经超滤管浓缩后用 1.5 mL EP 管分装, -80 $^{\circ}$ C 保存待用。

1.2.3 重组慢病毒感染 AP 细胞 消化并重悬一定的 AP 细胞, 准确计数后, 添加 2×10^4 个细胞于 6 孔板中央, 添加 2 mL 完全培养基。6 h 后对 AP 细胞进行重组慢病毒感染, 首先弃去 6 孔板中培养基, 替换 2 mL DMEM 培养基含有病毒 200 μ L (滴度 1.5×10^6 TU/L) 及 polybrene (2 μ L) 的混合液, 12 h 后更换完全培养基, 24 h 后观察 AP 细胞荧光蛋白 GFP 的表达情况。并将成功携带 pthvm-T1、T2、T3 及 Tc 的 AP 细胞命名为 AP-T1、AP-T2、AP-T3 及 AP-Tc。

1.2.4 RT-PCR 检测 AP 细胞 RNAi 效率 取感染后的 AP 细胞, 利用 life 提取试剂盒提取总 RNA, 并利用酶标仪测定 RNA 浓度及纯度后, 利用 Takara cDNA 反转录试剂盒反转录总 RNA, 然后利用 Roche SYBR 试剂盒进行荧光定量 PCR 反应, 选择 GAPDH 作为内参基因, 对结果进行校正, 每组试验设 3 个重复, 同时设空白对照, 以

AP-Tc 细胞作为对照, 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 15 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 57.3 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min 4 $^{\circ}$ C 保存。自动获取 C_t 值后, 利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 算法进行定量分析。针对 T β 10 设计的荧光定量 PCR 上下游引物: 5'-CACATCACGGCTAAGGTC-3'; 5'-GAGACGCAGGAGAAGAAC-3'。

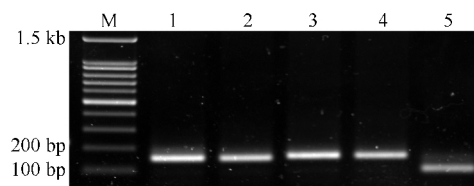
针对 GAPDH 内参基因设计的上下游引物: 5'-ATGTTTGTGATGGGCGTGAAC-3'; 5'-CACTA GAAGCAGGGATGATGTT-3'。

1.2.5 MTT 试验检测 AP 细胞增殖情况 消化 AP-T1、T2、T3 及 Tc 细胞并准确计数, 将细胞浓度调整为 5×10^4 mL, 取 200 μ L 细胞悬液于 96 孔板中, 设立 6 个重复, 统计分析时去掉最高值及最低值取 4 个重复进行, 接种 1 2 3 4 d 后, 每孔添加 20 μ L MTT 试剂, 继续培养 4 h 后, 停止培养, 小心弃去上清后, 加入 150 μ L DMSO 溶解, 摇床避光反应 10 min 后, 利用酶标仪在 490 nm 处测定吸光度。利用单因素方法分析, 计算差异显著性, 然后以时间为横坐标、吸光度为纵坐标绘制细胞增殖曲线。

2 结 果

2.1 重组阳性载体质粒 plvthm 的鉴定

空白质粒 plvthm 的 PCR 扩增片段大小为 105 bp, 而阳性克隆为 172 bp (插入片段为 67 bp), PCR 鉴定结果(图 1) 显示, 阴性对照中(图 1 中 5 号泳道) 扩增片段靠近 100 bp Marker, 而阳性克隆(图 1 中 1~4 号泳道) 扩增片段略小于 200 bp Marker, 与预期结果相符, 表明挑选的阳性克隆正是试验所需。测序结果最终确定阳性克隆中正确插入了所需的 shRNA, 即 RNAi 靶位点序列, 4 种阳性质粒分别命名为 plvthm-T1、plvthm-T2、plvthm-T3 和 plvthm-Tc。



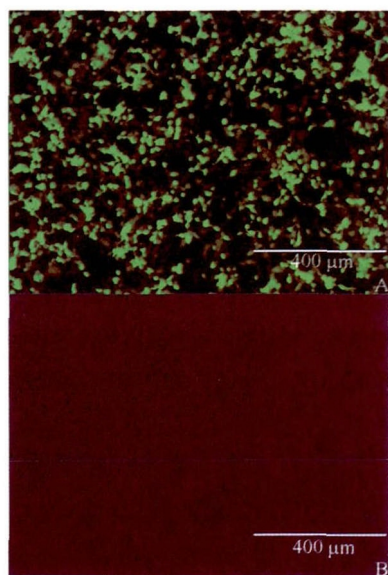
M. Marker; 1. plvthm-T1; 2. plvthm-T2; 3. plvthm-T3; 4. plvthm-Tc; 5. plvthm 空质粒

图 1 重组质粒 PCR 鉴定结果

Fig. 1. Identification of recombinant plasmids by PCR

2.2 重组慢病毒三质粒共转染 293T 细胞效果

在 293T 细胞中进行 X-tremeGENE HP 介导的 plvthm、pSPAX2 和 pMD2.G 3 质粒共转染 24 h 后,在倒置荧光显微镜下观察到大量的 GFP 荧光,荧光均匀分布于视野中,明暗交替呈无规则状(图 2-A)。在可见光下观察 293T 细胞生长旺盛,紧密排列,细胞呈不规则多边形,无死细胞或细胞碎片漂浮于上清中(图 2-B),表明质粒成功共转染 293T 并包装成慢病毒颗粒,经测定所得慢病毒滴度为 1.5×10^6 TU/L。



A. 倒置荧光显微镜下荧光表达情况; B. 倒置相差显微镜下细胞形态

图 2 3 质粒共转染 24 h 后的 293T 细胞

Fig. 2. Transfection of 293T cells by three plasmids after 24 h

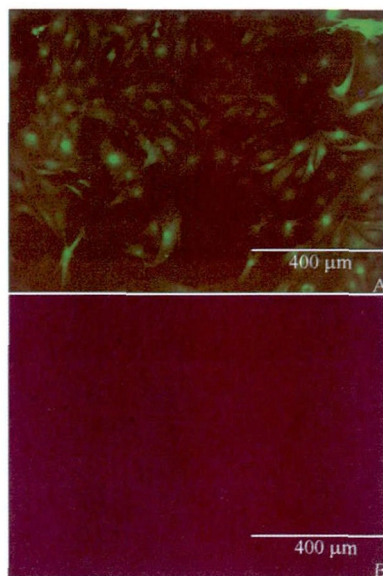
2.3 重组慢病毒感染梅花鹿生茸区骨膜 (AP) 细胞

用包装成功的慢病毒感染 AP 细胞,约 2 d 后在倒置荧光显微镜下观察。由图 3 可见,感染慢病毒的 AP 细胞,有大量绿色荧光分布于视野中,在可见光下可看到 AP 细胞生长状况良好。

2.4 荧光定量 PCR 检测 T β 10 基因下调效率

以插入阴性序列(无意义链)的 AP 细胞(AP-Tc)作为对照进行荧光定量 RT-PCR,通过溶解曲线可知, GAPDH 基因和 T β 10 基因均被特异性扩增。利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 分析方法进行数据分析, AP-T1, AP-T2, AP-T3, AP-Tc 相对表达量分别为 77.20, 74.80, 64.40, 100.00。与阴性对照 AP-Tc 相比, AP-T1、AP-T2 及 AP-T3 的 T β 基因都有所

下调。因此,可确定携带 plvthm-T1、T2 及 T3 的载体能够有效沉默 T β 10 基因的表达,沉默效率分别为 22.8%、25.2% 及 35.6%,其中最高沉默效率可达 35.6%。



A. 倒置荧光显微镜下荧光表达情况; B. 倒置相差显微镜下细胞形态

图 3 重组慢病毒感染的 AP 细胞(48 h)

Fig. 3. Infected AP cells by lentivirus (48 h)

2.5 MTT 法测定不同 AP 细胞增殖活力

胰酶消化 AP-T1、T2、T3 及 Tc 细胞(图 4)。

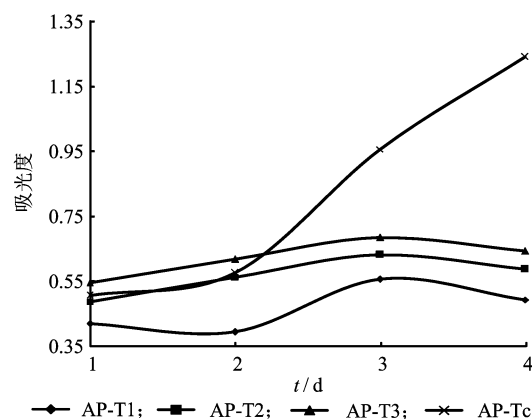


图 4 MTT 试验生长曲线

Fig. 4. Growth curve by MTT assay

由图 4 可见,进行 4 d 的 MTT 试验后, AP-T1、T2 及 T3 的增殖程度较对照 AP-Tc 弱 ($P < 0.05$), AP-T1、AP-T2 及 AP-T3 的生长曲线基本一致,几乎不出现增殖情况,并且在 4 d 时, AP-Tc 的吸光度达到 1.24,与之相比 AP-T1、T2 及 T3 的吸光度仅为 0.49、0.59 及 0.64,此时, AP-Tc 的增

殖速度较 RNAi 抑制组高 2 倍以上,说明 T β 10 的 RNAi 使 AP 细胞的增殖程度受到一定抑制。

3 讨 论

鹿茸由于其具有诸多特性,如周期性再生、干细胞依赖性、生长迅速、天然的软骨内成骨等,因此,是一个新兴的哺乳动物器官生物学模型。T β 10 不仅参加细胞活动还参与血管形成以及早期器官发育等^[11-12]。此外,尤其是在肿瘤以及炎症发生和恶化过程中均检测到 T β 10 的差异表达^[13-15]。因此,研究 T β 10 的功能及其作用机理显得尤为重要。鹿茸与肿瘤组织具有某些共同点,例如生长迅速、富含血管组织、基于干细胞(某些肿瘤中发现癌症干细胞),但鹿茸却是结构井然有序的正常组织而不癌化^[16-20]。利用鹿茸这个独特的模型进行 T β 10 的功能研究,尚处空白,国内外未见报道。本研究通过 RNAi 途径靶向沉默了 T β 10 在 AP 细胞中的表达,为研究 T β 10 基因提供了一种有效途径。

Shiotsuka 等^[21]研究发现在小鼠胚胎时期进行 T β 10 siRNA 处理能够显著抑制小鼠牙胚的增殖及发育。本试验利用慢病毒介导的 RNAi 技术,靶向沉默了 T β 10 在 AP 细胞中的表达,MTT 研究发现 T β 10 的沉默也能够显著抑制 AP 细胞的增殖,由于 AP 细胞属于鹿茸干细胞,本试验中,受到初始接种浓度以及干扰效率的影响,致使在 MMT 试验中不能准确判定 RNAi 组间的差异,但是 RNAi 各组与对照组间存在显著差异($P < 0.05$)。数据显示:对照组 AP-Tc 的增殖能力非常快,在 4 d 时吸光度达到 1.24,但是 T β 10 的干扰组(AP-T1、T2、T3)在 4 d 的吸光度却约为 0.5。因此,说明该因子在 AP 细胞增殖中扮演着重要角色,下一步可以进一步分析 T β 10 在鹿茸组织中,特别是对鹿茸软骨细胞增殖影响和对鹿茸软骨柱周围血管壁细胞的作用及相互关系。

此外,研究发现 T β 10 的差异表达还与许多器官的早期发育相关,如唾液腺、小脑以及肾脏等^[22-24]。鹿茸是一个在雄鹿进入青春期后才开始萌生的器官,现有早期器官的研究都是基于胚胎水平,因此研究受到种种限制。鹿茸则是后生的可以周期性再生的哺乳动物器官,且对称生长,可以为科学研究提供了天然对照组。因此,下一步可以利用鹿茸这一模型,探索 T β 10 在早期器

官发育中的作用。

参考文献:

- [1] Sribenja S, Li M, Wongkham S, et al. Advances in thymosin beta10 research: differential expression, molecular mechanisms, and clinical implications in cancer and other conditions [J]. *Cancer Invest*, 2009, 27(10): 1016-1022.
- [2] Lee S H, Son M J, Oh S H, et al. Thymosin β 10 inhibits angiogenesis and tumor growth by interfering with ras function [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(1): 137-148.
- [3] 刘从容, 马春树, 宁钧宇, 等. 不同转移潜能肿瘤细胞胸腺素 β 10 表达水平及微丝结构的差异性研究 [J]. *中华病理学杂志*, 2004, 33(1): 67-71.
- [4] 和金周, 周长林, 方宏清. 胸腺素 β 10 的研究进展 [J]. *生物技术通报*, 2012, 23(4): 613-615.
- [5] Li C, Zhao H, Liu Z, et al. Deer antler: A novel model for studying organ regeneration in mammals [J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2014, 56: 111-122.
- [6] Li C. Deer Antler regeneration: a stem cell-based epimorphic process [J]. *Birth Defects Research (Part C)*, 2012, 96: 51-62.
- [7] Li C, Yang F, Sheppard A. Adult stem cells and mammalian epimorphic regeneration-insights from studying annual renewal of deer antlers [J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2009, 4(3): 237-251.
- [8] Gao Zhiguang, Yang Fuhe, McMahon Chris, et al. Mapping the morphogenetic potential of antler fields through deleting and transplanting subregions of antlerogenic periosteum in sika deer (*Cervus nippon*) [J]. *Journal of Anatomy*, 2012(2): 131-143.
- [9] Li Chunyi, Yang Fuhe, Suttie Jimmy. Stem cells, stem cell niche and antler development [J]. *Animal Production Science*, 2011, 51: 267-276.
- [10] 郭倩倩, 王大涛, 褚文辉, 等. 利用慢病毒表达载体干扰梅花鹿角柄骨膜细胞 P21 基因 [J]. *吉林农业大学学报*, 2014, 36(1): 116-121.
- [11] 孙红梅, 杨福合, 邢秀梅, 等. 鹿茸再生干细胞成骨诱导(微粒体)培养体系的建立 [J]. *吉林农业大学学报*, 2010, 32(6): 680-683.
- [12] Mu H, Ohashi R, Yang H, et al. Thymosin beta10 inhibits cell migration and capillary-like tube formation of human coronary artery endothelial cells [J]. *Cell Motil Cytoskeleton*, 2006, 63(4): 222-30.
- [13] Li M, Zhang Y, Zhai Q, et al. Thymosin beta 10 is aberrantly expressed in pancreatic cancer and induces JNK activation [J]. *Cancer Invest*, 2009, 27(3): 251-256.
- [14] Sribenja S, Sawanyawisuth K, Kraiklang R, et al. Suppression of thymosin β 10 increases cell migration and metastasis of cholangiocarcinoma [J]. *BMC Cancer*, 2013, 13: 430.

(下转第 106 页)

- [11] Domingo E, Baranowski E, Escarmis E, et al. Foot-and-mouth disease virus[J]. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 2002, 25: 297-308.
- [12] 杨波, 杨帆, 王松豪, 等. 口蹄疫反向疫苗研究进展[J]. 病毒学报 2014, 30(2): 213-220.
- [13] Grgacic E V, Anderson D A. Virus-like particles: passport to immune recognition[J]. Methods, 2006, 40(1): 60-65.
- [14] Vieira H L, Esteve C, Roldao A, et al. Triple layered rotavirus VLP production: kinetics of vector replication, mRNA stability and recombinant protein production[J]. J Biotechnol, 2005, 120(1): 72-82.
- [15] Noad R, Roy P. Virus-like particles as immunogens[J]. Trends Microbiol, 2003, 11(9): 438-444.
- [16] Guo H C, Sun S Q, Jin Y, et al. Foot-and-mouth disease virus-like particles by a SUMO fusion protein approach in *Escherichia coli* induce potent protective immune responses in guinea pigs, swine and cattle[J]. Vet Res 2013, 44: 48.
- [17] Lee C D, Yan Y P, Liang S M, et al. Production of FMDV virus-like particles by a SUMO fusion protein approach in *Escherichia coli*[J]. J Biomed Sci 2009, 16: 69.
- [18] 杨春梅, 黄丽, 王海伟, 等. 口蹄疫病毒 3C 蛋白酶切割宿主蛋白 PCBP2[J]. 中国兽医学报 2014, 36(6): 419-422.
- [19] 孙超, 杨德成, 高荣远, 等. O 型口蹄疫病毒亚基因组复制子的构建及其鉴定[J]. 中国兽医学报 2014, 36(8): 611-614.
- [20] 董艳美, 张国广, 陈亮, 等. MS2 介导的口蹄疫类病毒颗粒疫苗的研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版) 2013(2): 237-243.

(责任编辑: 林海涛)

(上接第 96 页)

- [15] 杨继岚, 蒋永新. 胸腺素 $\beta 10$ 与恶性肿瘤相关性的研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(1): 258-259.
- [16] 张伟, 褚文辉, 路晓, 等. Thymosin $\beta 10$ 在不同模式动物或器官中功能的研究进展[J]. 基因组学与应用生物学, 2015, 34(3): 633-668.
- [17] Hu C, Niestroj M, Yuan D, et al. Treating cancer stem cells and cancer metastasis using glucose-coated gold nanoparticles[J]. Int J Nanomedicine 2015, 16(10): 2065-2077.
- [18] 曹航, 李当当, 王守堂, 等. Bcl-2 在梅花鹿茸角中的表达[J]. 中国兽医学报 2014, 34(8): 1300-1303.
- [19] 张晨, 曹航, 李当当, 等. 细胞周期蛋白 D1 在梅花鹿茸角中的表达[J]. 中国兽医学报 2014, 34(7): 1153-1156.
- [20] 肖宇奇. 鹿茸研究进展[J]. 经济动物学报 2011, 15(4): 221-224.
- [21] Shiotsuka M, Wada H, Kiyoshima T, et al. The expression and function of thymosin $\beta 10$ in tooth germ development[J]. Int J Dev Biol 2013, 57: 873-883.
- [22] Anadón R, Rodríguez Moldes I, Carpintero P, et al. Differential expression of thymosins $\beta 4$ and $\beta 10$ during rat cerebellum postnatal development[J]. Brain Res. 2001, 894(2): 255-65.
- [23] Gerosa C, Fanni D, Nemolato S, et al. Thymosin $\beta 10$ expression in developing human kidney[J]. J Matern Fetal Neonatal Med 2010, 23(3): 125-128.
- [24] Fanni D, Gerosa C, Nemolato S, et al. Thymosin $\beta 10$ expression in developing human salivary glands[J]. Early Hum Dev, 2011, 87(12): 779-783.

(责任编辑: 林海涛)