技术与方法 文章编号：0253-3626（2011）08-0949-05

结缔组织生长因子全长及其缺失突变体重组腺病毒的构建和鉴定

孙双双[1]，陈 红[1]，唐 敏[1]，施 琼[1]，黎玉叶[1]，王建伟[2]，周 兰[1]，何通川[1]，左国伟[1]

（1. 重庆医科大学临床检验诊断学教育部重点实验室；2. 重庆医科大学基础医学院组织学与胚胎学教研室，重庆 400016）

【摘 要】目的：结缔组织生长因子（Connective tissue growth factor，CTGF）含有 4 个不同功能结构域，构建表达带有 3×Flag 标签的全长基因及 5 个缺失突变体的重组腺病毒，以研究 CTGF 各结构域的功能和作用机制。方法：通过聚合酶链反应（Polymerase chain reaction，PCR）等克隆方法制备目标质粒 DNA，然后通过腺病毒穿梭载体与骨架载体的重组、包装构建全长 CTGF 和缺失突变体重组腺病毒。用 anti-Flag 抗体作为一抗做 Western blot 检测目的基因表达情况。结果：通过腺病毒基因组 DNA PCR 确认有 CTGF 全长和缺失突变体的存在；Western blot 法验证了 CTGF 全长和缺失突变体的表达。结论：成功构建了 6 个表达 CTGF 全长和缺失突变体的重组腺病毒，为进一步研究 CTGF 的结构域功能奠定了基础。

【关键词】结缔组织生长因子；缺失突变体；重组腺病毒

【中国图书分类法分类号】Q782 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-01-18

作者介绍：孙双双（1984-），女，硕士，
研究方向：分子肿瘤学。

通信作者：左国伟，男，讲师，Email:zuoguowei@gomail.com。

基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：30970872）。

深Ⅱ度烧伤的修复实质是肉芽组织中各种修复细胞增殖及分泌蛋白，成纤维细胞产生胶原而修补创面。本实验中应用孵育鸡蛋膜第 7 天的创面组织中 EGF、bFGF 及羟脯氨酸含量显著增高，同时创面愈合率显著高于对照组。EGF、bFGF 是促进组织愈合的两种重要因子，EGF 可直接刺激修复细胞内的蛋白质及细胞大分子的合成[6]。bFGF 可诱导成纤维细胞增殖，促进成纤维细胞形成胶原蛋白和肉芽组织[7]。羟脯氨酸为皮肤胶原中特有的氨基酸，其含量高低可提示胶原含量，而胶原蛋白含量的升高程度直接与组织修复正相关[8]。本实验结果提示，用孵育鸡蛋膜在深Ⅱ度烧伤早期促进创面愈合的机理可能为，使用孵育鸡蛋膜可促进创面组织 EGF、bFGF 蛋白表达增高，从而使创面组织中的胶原蛋白等有利于组织修复物质加速合成，导致深Ⅱ度烧伤早期创面愈合明显加快。

参 考 文 献

[1] Sheridan R L，Moreno C，Skin substitutes in burns[J].Burns，2001，27(1)：92-98.

[2] 严忠馥，郭寿延，王宝美.大鼠深Ⅱ度烫伤模型的病理研究[J].上海第二医科大学学报，1998，18(3)：222-223.

[3] Gajiated K，Gajiwala A L.Evaluation of lyophilized，gammairradiated amnion as biological dressing[J].Cell Tissue Bank，2004，5(2)：73-80.

[4] Ravishanker R，Bath A S，Rey R.“Amnion Bank”-the use of long tern glycerol preservel amniotic membranes in the management of su perficial and superficial partial thickness burns[J].Burns，2003，29(4)：369-374.

[5] 郭思覃.现代整形外科学[M].北京：人民军医出版社，2000.428.

[6] Kibe Y，Takenaka H，Kishimoto S.Spatial and temporal expression of basic fibroblast growth factor protein during wound healing of rat skin[J].Br J Dermatol，2000，143(4)：720-727.

[7] Bhora F Y，Dunkin B J，Batzvi S，et al.Effrct of growth factors on cell proliferation and epithelialization in human skin[J].J Surg Res，1995，59(2)：236-244.

[8] Portera C A，Love F J，Mermore L，et al.Effect of macrophage stim ulation on collagen biosynthesis in the healing wound[J].Am Surg，1997，63(2)：125-131.

（责任编辑：关蕴良）

Establishment of six adenoviruses that express the full length of connective tissue growth factor and its deletion mutants

SUN Shuang-shuang[1], CHEN Hong[1], TANG Min[1], SHI Qiong[1], LI Yu-ye[1], WANG Jian-wei[2], ZHOU Lan[1], HE Tong-chuan[1], ZUO Guo-wei[1]

(1. The Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics, Ministry of Education; 2. Department of Histology and Embryology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*: Connective tissue growth factor (CTGF), which contains four modules, plays an important role in both cell proliferation and differentiation. This study is to elucidate the distinctive function of each module, and to establish recombinant adenoviruses that express full length and deletion mutants of CTGF gene. *Methods*: Six plasmids containing full-length CTGF, CTGFCD1 (no module Ⅳ), CTGFCD2 (no module Ⅲ and Ⅳ), CTGFID1 (no module Ⅱ), CTGFID2 (no module Ⅲ), CTGFID3 (no module Ⅱ or Ⅲ) were constructed with Polymerase chain reaction (PCR) and gene cloning techniques. The corresponding adenoviruses were generated by recombination and packaging, and evaluated by PCR and Western blot. *Results*: The presence of full-length CTGF or CTGF deletion mutants in these recombinant adenoviruses was confirmed by DNA sequencing and PCR, and the expression of these CTGF constructs was confirmed by Western blot with anti-Flag antibody to the fusion 3×Flag tag at the C-terminus of these constructs. *Conclusion*: Six recombinant adenoviruses that express full-length CTGF and deletion mutants have been successfully established, which could facilitate the dissection of CTGF protein function.

【Key words】connective tissue growth factor; deletion mutant; recombinant adenovirus

结缔组织生长因子(Connective tissue growth factor, CTGF)是一种富含半胱氨酸的分泌性小分子量蛋白。CTGF 的表达受多种生长因子、细胞因子诱导,此外它还受到缺氧、机械压力等物理化学因素的诱导调控。CTGF 广泛参与细胞的增殖、分化、迁移、粘附和凋亡,从而在干细胞分化和肿瘤发生等过程中发挥着重要作用。众多细胞因子和信号通路可以介导 CTGF 发挥作用,如整合素、骨形态发生蛋白、血管内皮生长因子、Wnts 和 Notch 等[1]。其中,整合素介导的信号传递具有组织和细胞特异性, 根据细胞外基质不同而作用各异。CTGF 蛋白的一个非常明显的特点是具有 4 个相对独立的结构域,每个结构域都与其他的生长因子或调节分子有基因同源性和结构相似性。这 4 个结构域分别是:①胰岛素样生长因子结合蛋白;②von Willebrand 因子 C 重复结构域;③血小板反应蛋白 1 型重复结构域;④C 末端结构域。

在 CTGF 蛋白的 von Willebrand 因子 C 重复结构域后,有一段长度和氨基酸组成变化很大的片段,可能作为连接区连接 CTGF 的前两个结构域和后两个结构域[2,3]。近来的研究数据表明 CTGF 蛋白 4 个结构域之前的连接区域可能对蛋白酶的作用敏感。在这些连接区域的切割可能会导致截短型的 CTGF 或单个结构域的产生[4],这些分子可能发挥着与完整的 CTGF 完全不同的生物学功能。进而,这些切割和断裂可能是调节 CTGF 蛋白的生物学功能的另外一种机制[5,6]。我们课题组发现 CTGF 在成骨过程中发挥着重要作用[7],为研究 CTGF 各个结构域在此过程中的作用,我们分别克隆和构建了 6 个重组腺病毒,分别表达全长和 5 个缺失突变体的 CTGF 基因。

1 材料与方法

1.1 材料

Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 聚合酶、小牛小肠碱性磷酸酶(Calf intestinal alkaline phosphatase, CIAP)、T4 DNA 连接酶、Phusion™ 高保真性 PCR 试剂盒、限制性核酸内切酶 *Hind*Ⅲ、*Xho* Ⅰ、*BamH* Ⅰ、*EcoR* Ⅴ购自 New England Biolabs 公司;1 kb Plus DNA 分子量标准和 dNTPs 购自 Invitrogen 公司;完全蛋白酶抑制剂混合片购自 Roche 公司;小鼠 M2 抗 FLAG 抗体,以及所有化学试剂(除非特别说明)均购自 Sigma Aldrich 公司或Fisher Scientific公司;所有引物均由Integrated DNA Technologies 公司合成;所有测序均由上海生物工程有限公司完成。本研究所用到的质粒 pMOK, pSEB-3F, pAdTrace-TO4 均由芝加哥大学医学中心分子肿瘤实验室提供。

1.2 克隆步骤

在本实验中我们做了一系列的克隆工作(所有克隆产物均经过 DNA 测序):

(1)CTGF-F1(涵盖结构域Ⅰ和分泌信号肽)和 CTGF-F3(涵盖结构域Ⅰ和Ⅱ)片段分别用引物1207/2165和1207/2167做 PCR 获得(见图 1)。

(2)将 CTGF-F1 和 CTGF-F3 片段用 *Hind*Ⅲ和 *Xho* Ⅰ内切酶消化,插入质粒 pMOK 的相应酶切位点。所获得的 2 个新质粒分别命名为 pMOK-CTGF-F1 和 pMOK-CTGF-F3。

(3)CTGF-F2(涵盖结构域Ⅲ和Ⅳ)和 CTGF-F4(涵盖结构域Ⅳ)片段分别用引物2166/1208和2168/1208做PCR获得。

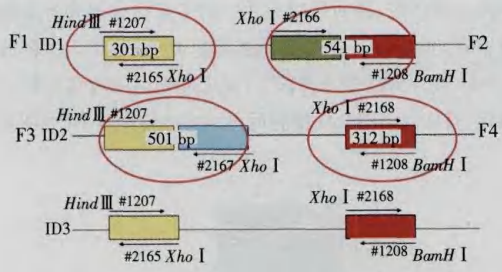


图 1　CTGF 基因的 4 个片段（F1、F2、F3 和 F4）在 CTGF 基因中的位置示意图

(4)片段 CTGF-F2 用内切酶 *Xho* Ⅰ和 *BamH* Ⅰ消化，插入质粒 pMOK-CTGT-F1 的相应酶切位点，新质粒称为 pMOK-CTGFID1。

(5)片段 CTGF-F4 用内切酶 *Xho* Ⅰ和 *BamH* Ⅰ消化，插入质粒 pMOK-CTGF-F3 的相应酶切位点，新质粒称为 pMOK-CTGFID2。

(6)片段 CTGF-F4 用内切酶 *Xho* Ⅰ和 *BamH* Ⅰ消化，插入质粒 pMOK-CTGF-F1 的相应酶切位点，新质粒称为 pMOK-CTGFID3。

(7)用内切酶 *Hind* Ⅲ和 *BamH* Ⅰ消化质粒 pMOK-CTG-FID1/ID2/ID3，释放片段 CTGF-ID1/ID2/ID3，将该片段插入质粒 pSEB-3F 的相应酶切位点，新质粒命名为 pSEB-CTGF-ID1/ID2/ID3-3F(在这里，3F 代表 3×Flag 标签，即在目的基因后面融合了一段表达 3×Flag 的 DNA 序列，3×Flag 的活性可能会受其融合蛋白折叠的影响。通过用 anti-Flag 抗体检测 3×Flag 标签，可以有效的鉴定与其融合的 CTGF 全长及其缺失突变体的表达情况)。

(8)用内切酶 *Pac* Ⅰ消化质粒 pSEB-CTGFID1/ID2/ID3-3F，T4 DNA 聚合酶补平末端，再用内切酶 *Hind* Ⅲ消化，释放片段 CTGFID1/ID2/ID3-3F。

(9)将片段CTGFID1/ID2/ID3-3F插入质粒pAdTrace-TO4(该质粒用内切酶 *Hind* Ⅲ和 *Eco*RV 消化)，新质粒命名为 pAdTrace-CTGF-ID1/ID2/ID3-3F。

(10)CTGF 全长、CTGFCD1 和 CTGFCD2 片段分别用引物 1207/1208、1207/679 和 1207/2167 做 PCR 获得。按照上述步骤 7~9 将这 3 个片段先克隆到质粒 pSEB-3F，再亚克隆到腺病毒穿梭载体 pAdtrace-TO4 上，最终得到的 3 个质粒分别命名为 pAdTrace-CTGF-3F、pAdTrace-CTGFCD1-3F 和 pAdTrace-CTGFCD2-3F。

1.3　腺病毒重组

首先制作大肠杆菌 BJ5138 的感受态细胞，将腺病毒骨架载体 pAdEasy-1 通过电转导入该感受态细胞。涂布在含有卡纳霉素的 LB 平板上进行筛选，含有 pAdEasy-1 质粒的 BJ5138 细菌称为 BJ/Ad 细菌。然后，制作 BJ/Ad 细菌的感受态。在克隆步骤获得的 6 个质粒如 pAdTrace-CTGF-3F，用内切酶 *Pme* Ⅰ消化使之线性化，纯化后电转入 BJ/Ad 感受态细菌。涂布在在含有卡纳霉素的 LB 平板上 37℃过夜培养，挑选针尖大小(最小)的菌落摇菌，提取质粒电泳鉴定。

1.4　腺病毒包装

含有目的基因的质粒 pAdTrace-TO4 与骨架质粒 pAdEasy-1 在 BJ5183 细菌中重组后，小量提取质粒，用限制性内切酶 *Pac* Ⅰ消化使之线性化，乙醇沉淀纯化后用脂质体转染处于对数生长期的 HEK293 细胞。转染后 37℃，5% CO_2 孵箱中过夜培养，第 2 天在荧光显微镜下观察红色荧光，判断转染效率。如转染效率在 50%以上，加入大量新鲜培养基，继续培养 2~3 周。如有彗星现象出现，表明腺病毒包装成功。

1.5　用基因组 DNA 进行 PCR 鉴定

用包装好的腺病毒经 2 次感染 HEK293 细胞扩增后，获得高滴度的腺病毒溶液。取 20 μl 病毒液加入到 100 μl 蛋白酶 K 缓冲液中，50℃孵育 4 h 或过夜。加入 200 μl ddH_2O 稀释蛋白酶 K 缓冲液，最高速离心 1 min 去除细胞碎片等杂质。加入酚-氯仿抽提 2 次。将上层水相转移到 1 个新离心管中，加入冰乙醇沉淀 DNA，70%乙醇洗涤 2 次，干燥后的沉淀(细胞和腺病毒的基因组 DNA)溶于 200 μl ddH_2O 中。以 1 μl基因组 DNA 作为模板，1207/1208 号引物(见表 1)各 1 μl，在 15 μl 的 PCR 反应体系中。PCR 条件：94℃，5 min；94℃ 30 s，56℃ 30 s，72℃ 30 s，30 个循环；72℃ 5 min。反应结束后以取 10 μl 产物进行琼脂糖凝胶电泳。

1.6　Western blot 鉴定

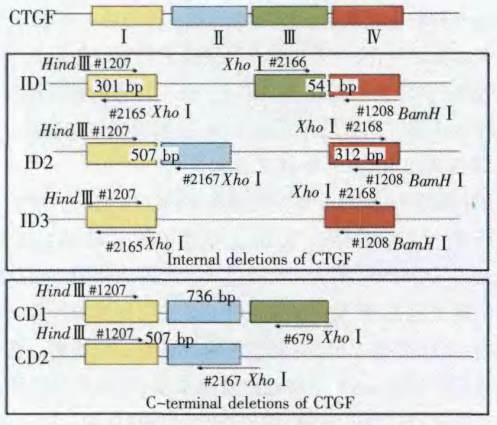
用腺病毒感染 COS2 细胞，次日在荧光显微镜下观察感染效果，36~48 h 收获细胞。提取 50 μg 细胞总蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳，用湿转法(美国 Bio-Rad)将电泳产物转移到膜上，5%脱脂奶粉 37℃封闭 2 h，加小鼠 M2 抗 FLAG 抗体(1:200)4℃过夜，TBST 洗膜 3 次后，加兔抗鼠二抗(1:5 000)37℃ 2 h，TBST 洗膜 3 次，按 ECL 试剂盒说明进行显色，GelDoc(美国 Bio-Rad)凝胶成像仪采集图像。

表 1　构建 CTGF 缺失突变体所用到的引物及其序列

序号	名称	序列
679	CTGF Rev no moduleⅣ	ccg ctc gag cag gtc agc ttc gca ggg cct gac
1 207	CTGF Fwd	ccc aagctt accatgggc atg ctc gcc tcc gtc gca ggt cc
1 208	CTGF Rev	cgc ggatcc cgc cat gtc tcc gta cat ctt cct g
2 165	CTGF-ID1 Rev	ccg ctcgag tgc acc atc ttt ggc agt gca cac
2 166	CTGF-ID1 Fwd	ccg ctcgag gac cgc aca gca gtt ggc cct gcc
2 167	CTGF-ID2 Rev	ccg ctcgag ctt ggg ctc gtc aca cac cca c
2 168	CTGF-ID2 end Fwd	ccg ctcgag gaa aac att aag aag ggc

2 结 果

本实验中构建了 CTGF 的全长及 C 末端和中间缺失突变体的重组腺病毒质粒。图 2 是 CTGF 缺失突变体的结构示意图，图中标明了与 PCR 引物互补的序列在 CTGF 全长中的位置。需要说明的是 CTGF 的分泌信号肽未专门画出，而是将其和结构域Ⅰ一同考虑，标为结构域Ⅰ。所有克隆均经测序确认。最终将克隆的 pAdTrace-CTGF/ID1/ID2/ID3/CD1/CD2-3F 用酶 *Pme* Ⅰ酶切，转化入 BJ/AdEasy 感受态细胞与腺病毒骨架载体 pAdEasy-1 进行重组。重组后的质粒经 *Pac* Ⅰ酶切，转染入 HEK 293 细胞进行腺病毒包装。由于本研究中构建了十几个质粒，所以在结果中不能完整展示，只用 1 个质粒来说明构建的过程。

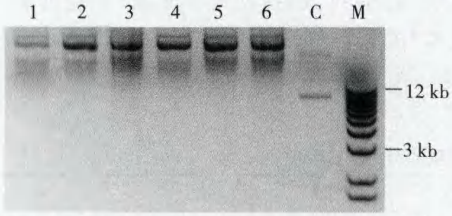


Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ和Ⅳ分别代表 CTGF 的 4 个结构域

图 2　CTGF 基因全长及其缺失突变体的结构示意图及它们的 PCR 策略

2.1　腺病毒穿梭载体与骨架载体的重组

腺病毒骨架载体 pAdEasy-1 全长约 33.4 kb。含有目的基因的穿梭载体 pAdTrace-TO4（约 9.1 kb）与骨架载体重组为一个质粒后，长度明显变大，电泳泳动速度减慢。0.8%琼脂糖凝胶电泳显示重组后的 6 个克隆比对照质粒泳动速度明显减慢，说明重组成功（见图 3）。



M. 1 kb Plus DNA Ladder；C. 未经重组的 pAdTrace-CTGFID1 质粒作为阴性对照；1~6. 6 个重组克隆（小量提取的质粒 DNA）

图 3　pAdR-CTGFID1 超螺旋质粒

2.2　*Pac* Ⅰ酶切重组后的腺病毒载体

经琼脂糖凝胶电泳鉴定的重组后的 pAdR-CTGFID1，用限制性内切酶 *Pac* Ⅰ消化后再进行电泳，显示释放出一条分子量较小的条带，说明重组成功。由于穿梭载体和骨架载体的重组有两种形式，所以正确的重组经 *Pac* Ⅰ酶切应释放一个 3.5 kb 或 4.5 kb 的小片段。*Pac* Ⅰ酶切后的重组质粒已经线性化，转染入 HEK293 细胞后可以增加转染效率（见图 4）。

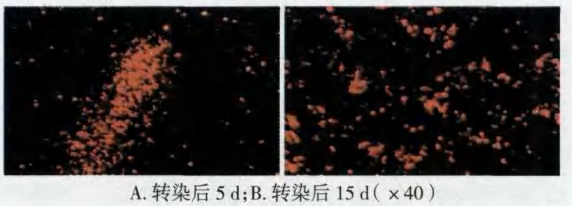


M. 1 kb Plus DNA Ladder；1. 经 *Pac* Ⅰ酶切后的 pAdR-CTGFID1 质粒

图 4　*Pac* Ⅰ限制性内切酶消化后的 pAdR-CTGFID1 质粒

2.3　腺病毒包装

重组后的质粒（如 pAdTrace-CTGFID1）经 *Pac* Ⅰ酶切后用脂质体转染入 HEK293 细胞。转染 4~5 d 后可见腺病毒包装所致特异的彗星现象（见图 5A）；转染 15 d 后包装结束，最终几乎所有的 HEK293 细胞均完全漂浮（见图 5B）。

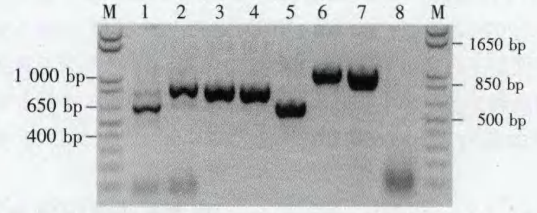


A. 转染后 5 d；B. 转染后 15 d（×40）

图 5　腺病毒在 HEK 293 细胞中的包装

2.4　腺病毒基因组 DNA PCR 确认 CTGF 全长和缺失突变体的存在

我们选择与 CTGF 最前端和最末端互补的 1207/1208 号引物进行 PCR（见图 6）。全长 CTGF 基因获得的 PCR 片段最长，缺失 1 个或 2 个结构域的突变体所获得的 PCR 条带相应缩短。第 1~7 泳道的条带大小预计为 507、736、842、819、613、1 047、1 047 bp。结合图 6 中各条带的位置，可以推测实验结果和预期相符。需要注意的是第 7 泳道为阳性对照，条带较浓，含有的 DNA 量较多，泳动速度比正常速度稍快些。



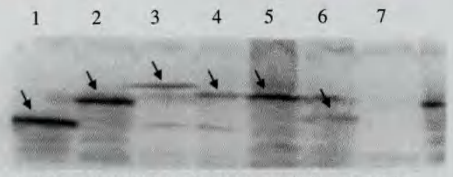
M. 1 kb Plus DNA Ladder；1~8. AdR-CTGFCD2、AdR-CTGFCD1、AdR-CTGFID1、AdR-CTGFID2、AdR-CTGFID3、AdR-CTGF 全长、pSEB-CTGF-3F 质粒（作为阳性对照）和 Ad-RFP（作为阴性对照）

图 6　腺病毒基因组 DNA PCR

2.5　Western blot 法确认 CTGF 全长和缺失突变体的表达

由于 CTGF 全长及缺失突变体均与 3×Flag 标签融合表达，因此通过 Western blot 检测 3×Flag 标签表示 CTGF 及其

突变体的表达(见图 7)。泳道 3 的条带(CTGF 蛋白全长)明显慢于泳道 2、4 和 5(缺失 1 个结构域),而泳道 1 和 6 的条带(缺失 2 个结构域)泳动速度最快。



1~7. CTGFCD2、CTGFCD1、CTGF 全长、CTGFID1、CTGFID2、CTGFID3 和 Ad-RFP(作为阴性对照)

图 7 Western blot 检测 CTGF 及其缺失突变体的表达

3 讨 论

CTGF 是 CCN（为 CTGF、Cyr61、NOV 第一个字母缩写）家族中的成员,又称 CCN2,是分泌性小分子量蛋白,作为一种多功能的生长因子,参与了体内的多种生理和病理过程,在胚胎发育、纤维化疾病以及骨折愈合,尤其是在肿瘤发生和干细胞分化等过程中发挥着重要作用[8,9]。CTGF 功能的复杂性还在于其可被细胞内的蛋白酶切割,形成不同的片段,发挥不同的作用。例如 CTGF 过表达,可以直接或间接促进间充质干细胞发生成骨性分化[10],其 C 末端区域及其全长可以促进人类骨髓间充质干细胞的增殖和迁移[11], 因此 CTGF 在组织工程和细胞疗法中起着不可替代的作用。为了进一步研究 CTGF 各个结构域的功能,我们分别克隆和构建了 6 个重组腺病毒,分别表达全长和 5 个缺失突变体的 CTGF 基因。

腺病毒生物学的特征赋予了该病毒载体应用的特性,使用腺病毒作为外源基因 CTGF 的导入载体可以感染除血液细胞外的几乎所有类型的细胞,且基因转移不受细胞分裂状态的影响即包括非分裂细胞,另外腺病毒载体纯化滴度高,所携带基因的表达水平也很高其感染和复制过程不整合入宿主细胞基因组因而遗传毒性低等优点。在本研究中我们使用了 He 等[12]创立的 pAdEasy 腺病毒载体系统。该系统含有腺病毒大部分基因组的骨架载体以超螺旋的形式存在,避免了经常的酶切操作;腺病毒重组过程中利用了大肠杆菌内高效的同源重组机制不需要连接步骤,重组率高;腺病毒载体中含有一个红色荧光蛋白基因,可以直接方便的观察感染和表达效率。携带 CTGF 基因的重组腺病毒表达载体的构建、包装和扩增,根据 He 等方法进行的同时,根据实际情况做了部分调整。本研究中,由于 CTGF 的缺失突变体缺失了不同的结构域,因此无法用同一个 CTGF 抗体检测所有的 CTGF 突变体,故我们首先将 CTGF 基因的全长、2 个 C 末端缺失突变体和 3 个中间缺失突变体克隆到 pSEB-3F 质粒, 然后亚克隆到 pAdTrace-TO4 腺病毒载体。在 pSEB-3F 质粒上,目的基因后面融合了一段表达 3×Flag 的 DNA 序列,3×Flag 是一段很小的、疏水性的、含有肠激酶酶切位点的氨基酸序列,它最大程度的减少了改变其他蛋白质功能、阻断其他表位和降低水溶性的作用。然而,3×Flag 的活性可能会受其融合蛋白折叠的影响。所以,通过用 anti-Flag 抗体检测 3×Flag 标签,可以有效的鉴定与其融合的 CTGF 全长及其缺失突变体的表达情况。

通过本研究,我们运用该系统并通过一系列的分子克隆工作,最终构建了 6 个重组腺病毒,分别表达 CTGF 全长、CTGFCD1、CTGFCD2、CTGFID1、CTGFID2 和 CTGFID3,并用基因组 DNA PCR 和 Western blot 的方法鉴定了其存在和表达情况。这些 CTGF 全长和缺失突变体重组腺病毒的成功构建为进一步研究 CTGF 的各个结构域功能奠定了良好的基础。

参 考 文 献

[1] Zuo G W,Kohls C D,He B C,et al.The CCN proteins:important signaling mediators in stem cell differentiation and tumorigenesis[J]. Histol Histopathol,2010,25(6):795-806.

[2] Bork P.The modular architecture of a new family of growth regulators related to connective tissue growth factor[J].FEBS Lett,1993,327(2):125-130.

[3] Lau L F,Lam S C.The CCN family of angiogenic regulators:the integrin connection[J].Exp Cell Res,1999,248(1):44-57.

[4] Brigstock D R.The connective tissue growth factor/cysteine-rich 61/nephroblastoma overexpressed (CCN) family[J].Endocr Rev,1999,20(2):189-206.

[5] Perbal B.The CCN family of genes:a brief history[J].Mol Pathol,2001,54(2):103-104.

[6] Perbal B.CCN proteins:multifunctional signalling regulators [J]. Lancet,2004,363(9402):62-64.

[7] Luo Q,Kang Q,Si W,et al.Connective tissue growth factor (CTGF) is regulated by Wnt and bone morphogenetic proteins signaling in osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells[J].J Biol Chem,2004,279(53):55958-55968.

[8] Arnott JA,Zhang X,Sanjay A,et al.Molecular requirements for induction of CTGF expression by TGF-beta1 in primary osteoblasts[J]. Bone,2008,42(5):871-885.

[9] Kawaki H,Kubota S,Suzuki A,et al.Functional requirement of CCN2 for intramembranous bone formation in embryonic mice[J]. Biochem Biophys Res Commun,2008,366(2):450-456.

[10] Wang J J,Ye F,Cheng L J,et al.Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells promoted by overexpression of connective tissue growth factor[J].J Zhejiang Univ Sci B,2009,10(5):355-367.

[11] Ono M,Kubota S,Fujisawa T,et al.Promotion of hydroxyapatite-associated,stem cell-based bone regeneration by CCN2[J].Cell Transplant,2008,17(1-2):231-240.

[12] He T C,Zhou S,da Costa L T,et al.A simplified system for generating recombinant adenoviruses[J].Proc Natl Acad Sci USA,1998,95(5):2509-2514.

（责任编辑:关蕴良）