

外源性 NGF 对转基因 CGRP 干细胞移植治疗骨质疏松大鼠的影响

莫林海¹ 庄宁² 刘成龙^{1*} 罗瑜³ 李松建¹ 杨少华⁴ 赵海军⁴ 刘建休¹ 黄世嘉¹

1. 南方医科大学珠江医院骨外科, 广州 510282

2. 南方医科大学珠江医院麻醉科, 广州 510282

3. 成都军区总医院心内科, 成都 610083

4. 南方医科大学珠江医院普外科, 广州 510282

中图分类号: R456 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2015) 12-1445-06

摘要: **目的** 研究外源性神经生长因子(nerve growth factor, NGF)对转基因降钙素基因相关肽(calcitonin gene related peptide, CGRP)骨髓干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)移植治疗骨质疏松大鼠的影响。**方法** 构建 CGRP 基因表达载体, 转染制备转基因 CGRP-MSCs 靶细胞; 60 只雌性 SD 大鼠骨质疏松模型随机均分为空白对照组(A 组)、单纯 MSCs 移植治疗组(B 组)、CGRP-MSCs 移植治疗组(C 组)、CGRP-MSCs + NGF 移植组(D 组)。在治疗 1w、2w、3w 后, 实时定量荧光 PCR 和 Western blot 检测 3 个时间段每组大鼠股骨组织中 CGRP 基因和蛋白的相对表达水平, 评价各组疗效。**结果** 与 A 组比较, 3 个时间点, C 组和 D 组中 CGRP 表达水平均显著上调($P < 0.01$); 治疗 1w 后, C 组和 D 组上调水平差异明显($P < 0.01$), D 组低于 C 组; 治疗 2w 后, C 组和 D 组之间仍保持显著差异($P < 0.05$), D 组仍低于 C 组; 治疗 3w 后, C 组和 D 组上调水平差异明显缩小, 二者差异无统计学意义($P > 0.05$)。CGRP 基因和蛋白相对表达水平在各组检测结果差异一致, 同上。**结论** 在转基因 CGRP-MSCs 移植治疗骨质疏松大鼠中联合应用外源性 NGF, 无累加效应, 并可能抑制大鼠股骨组织中 CGRP 的表达, 表明外源 NGF 于转基因 CGRP-MSCs 移植治疗骨质疏松症中可能并无促进作用, 至少在 CGRP 表达层面无促进作用, 而单纯的转基因 CGRP-MSCs 移植治疗骨质疏松大鼠疗效优于联合应用外源性 NGF 治疗方案。

关键词: 降钙素基因相关肽; 骨髓干细胞移植; 神经生长因子; 骨质疏松; 骨代谢

The effect of exogenous NGF on the treatment of osteoporosis with CGRP gene transgenic MSCs transplantation in rats

MO Linhai¹, ZHUANG Ning², LIU Chenglong^{1*}, LUO Yu³, LI Songjian¹, YANG Shaohua⁴, ZHAO Haijun⁴, LIU Jianxiu¹, HUANG Shijia¹

1. Department of Orthopedics, Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510282

2. Department of Anesthesia, Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510282

3. Department of Cardiology, Chengdu Military General Hospital, Chengdu 610083

4. Department of General, Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510282, China

Corresponding author: LIU Chenglong, Email: liucw878@163.com

Abstract: **Objective** To investigate the effect of exogenous nerve growth factor (NGF) on osteoporotic rats under therapy with mesenchymal stem cell (MSC) transfected with calcitonin gene related peptide (CGRP) gene. **Methods** Vectors express CGRP were constructed and transfected to CGRP-MSCs target cells. Sixty female osteoporotic SD rats were randomly divided into the control group (group A), simple MSCs transplantation treatment group (group B), CGRP transgenic MSCs (CGRP-MSCs) transplantation treatment group (group C), and CGRP-MSCs transplantation with exogenous NGF (CGRP-MSCs + NGF) treatment group (group D). At 1, 2, and 3 weeks after the treatment, CGRP expression levels in the femurs was measured using real-time PCR and Western blotting. The efficacy was compared between each group. **Results** Compared with control group, CGRP

基金项目: 广东省自然科学基金(9151051501000054); 广东省科技计划项目(2011B031800064)

* 通讯作者: 刘成龙, Email: liucw878@163.com

expression in Group C and D were both significantly up-regulated ($P < 0.01$) at all time. After 1-week treatment, the difference between group C and D was significant ($P < 0.01$). The expression in group D was significantly lower than that in the group C. After 2-week treatment, the difference between group C and D was still significant ($P < 0.05$), and the expression in group D was still significantly lower than that in group C. After 3-week treatment, the up-regulation difference in group D and C became narrower, and the difference was not statistically significant ($P > 0.05$). The results of CGRP gene and protein expression were consistent in all groups. **Conclusion** This study suggests that additional application of exogenous NGF may inhibit CGRP expression when CGRP gene transgenic MSCs transplantation therapy is applied in osteoporosis rat model, indicating that additional application of exogenous NGF has no benefit to the effect of CGRP, at least on CGRP gene expression level. CGRP gene transgenic MSCs transplantation therapy without exogenous NGF is better than additional application of exogenous NGF.

Key words: Calcitonin gene related peptide; Marrow stromal cells; Nerve growth factor; Osteoporosis; Bone metabolism

骨质疏松症是威胁老年人群健康的常见病之一, 身体机能退化及内分泌功能下降是引起老年人群骨代谢水平失衡, 发生骨质疏松的主要原因^[1]。近年来研究证实, 骨的代谢活动受骨组织中的神经系统调控, 并与骨质疏松症的发生密切相关^[1-2]。同时免疫细胞化学研究也证实骨膜、骨皮质、骨小梁、骨髓中存在感觉和自主神经纤维, 传递各种神经生物因子(如神经肽、儿茶酚胺和神经营养因子), 通过手术和化学方式去神经化可引起骨骼的表型变化, 直接证实神经调控在骨代谢中扮演重要的角色^[3]。在相关神经肽中, 降钙素基因相关肽(calcitonin gene related peptide, CGRP)的深入研究表明其对成骨、破骨细胞活动均有影响, 能促进骨的形成和抑制骨的吸收。将 CGRP 基因移植到小鼠后, 可发现成骨细胞中 CGRP 过表达, 骨小梁密度增加。另外, Valentijn K 等^[4]也报道 CGRP 基因疗法增加成骨细胞中 CGRP 表达而预防性治疗卵巢切除的大鼠发生骨质疏松症, 进一步证实 CGRP 可通过促进骨形成和抑制骨吸收来调控骨代谢及影响骨组织的表型。神经生长因子(nerve growth factor, NGF)是骨代谢中另一重要的递质及调节因子, Nakanish^[5]和 Jehan^[6]曾分别报道: 成骨细胞能自发分泌 NGF, 并保存 NGF 及其受体, 从而诱导成骨细胞的自身磷酸化, 促进骨代谢。另外, NGF 还可诱发骨的营养代谢活动, 提高骨的修复率, 并增强大鼠肋骨骨折修复后的骨痂生物机械强度^[7], 刺激兔的下颌骨感觉神经再生及神经周围类骨样组织的形成^[8]。

目前骨质疏松症治疗研究证实, CGRP 基因疗法和 NGF 均表现不同潜力。但在骨质疏松动物模型中, CGRP 基因治疗联合外源性 NGF 的应用是否会获得累计效应、在对 CGRP 表达方面具体影响尚无报道, 本实验仅针对此问题做出研究。

1 材料与方法

1.1 实验动物和主要材料仪器

1.1.1 实验动物: 选用 4 月龄雌性 SD 大鼠 70 只(60 只建模分组, 5 只获取靶细胞, 5 只备用), 体重 190 ~ 275 g(南方医科大学实验动物中心提供, 饲养南方医科大学实验动物中心), 恒温(22℃ ~ 26℃)、恒湿(湿度 50% ~ 60%)的清洁环境, 标准自由摄食、饮水适应饲养 1w 后备用。

1.1.2 主要材料及仪器: 凝胶成像系统(上海培清科技有限公司); 冷冻低温离心机[珠海黑马(HEMR)公司]; 电泳设备(Tanoan 公司); 引物设计序列分析软件 Clone Manager Suite 7 和 Primer premier 5.0 引物设计软件; 荧光定量 PCR 仪(四通道实时荧光定量 PCR 仪); DNA 凝胶纯化试剂盒[天根生化(北京公司)]; 引物合成由上海英骏生物公司提供; 载体构建及质粒重组(PIK 包装质粒与 pBaBb-puro-CGRP)广州达安生物公司构建。

1.2 实验方法

1.2.1 骨质疏松模型建立: 取 60 只大鼠连续维甲酸灌胃饲养 14 天, 饲养环境: 恒温(22℃ ~ 26℃)、恒湿(湿度 50% ~ 60%)的清洁环境, 标准自由摄食、饮水适应环境, 日剂量 70 mg/kg^[9], 构建骨质疏松模型。

1.2.2 MSCs 提取及培养: 另取 5 只同源大鼠获取股骨, 参照文献^[10]方法, 去除长骨两端暴露骨髓腔, DMEM/F12 培养基冲洗髓腔, 获骨髓组织, 制成细胞悬液, 800 rpm/min 离心 5min, 弃上清液后, 10% FBS 的 DMEM/F12 培养基重悬后, 置 37℃、5% CO₂ 培养箱 24 h, 弃未贴壁细胞, 更换培养基(1 次/3d), 增殖融合后, 用 0.25% 胰蛋白酶消化分离, 10% FBS 的 DMEM/F12 培养基接种、传代, 获充足 MSCs。

1.2.3 pBaBb-puro-CGRP 载体构建: 参照文献^[11]介绍方法, 载体构建及质粒重组。CGRP 基因的扩

增与纯化由广州达安生物公司完成,经验证后使用。检测:用琼脂糖凝胶(1.5%)电泳检测 PCR 反应产物。纯化:酶切产物用的 PCR 产物纯化试剂盒(天根生化公司)进行纯化回收。用 EcoR I 和 BamH I 对纯化后的 CGRP 基因产物和 pBaBb-puro-CGRP 载体酶切。T4 DNA 连接酶连接:将 pBaBb-puro-CGRP 的重组质粒转化大肠杆菌 DH5 α ,经过菌落 PCR,酶切鉴定(由上海英骏生物技术公司)。

1.2.4 MSCs 基因转染:用 293FT(人胚肾)细胞系扩增 pBaBb-puro-CGRP 载体后,病毒液中转染备用。消化处对数生长期的 MSCs,在密度为 5×10^5 时接种到 6 cm 培养皿中,待细胞生长至 70% 融合时,用 pBaBb-puro-CGRP 2 ug/ml 的腺病毒液转染,37℃ 孵育 3 h 后弃上清,再次转染,重复 3 次。转染 48 h 后,用含嘌呤霉素(0.5 ug/ul)的培养基筛选获得稳定细胞株。

1.2.5 实验处理和 CGRP 表达分析:将 60 只骨质疏松动物模型随机均分为 A 组[对照组(未作任何治疗)]、B 组(单纯 MSCs 移植治疗组)、C 组(CGRP-MSCs 移植治疗组)、D 组[CGRP-MSCs + NGF(外源性)移植治疗组],上述各组均在同天内接受不同治疗处理。细胞移植方式为尾静脉单次注

射 1×10^5 cells。外源性 NGF 联合使用方式为腹腔注射 2.0 u/(kg·d),每天一次,连续 3 天,与 CGRP-MSCs 移植同时进行。分别在治疗 1、2、3 w 后,处死各组 5 只大鼠,获取股骨骨组织,用实时荧光定量 PCR 检测 CGRP mRNA 的相对表达水平,Western blot 检测 CGRP 蛋白质相对表达水平[Bradford 测定法(Bio-Rad 公司 Laboratory-里斯)](β -actin 内参)。
1.2.6 统计学方法:所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 18.0 软件分析。采用双侧配对 *t* 检验组间差异性比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CGRP 蛋白表达水平的比较(见图 1、表 1 和图 2)

Western blot 分析,与 A 组比较,治疗后的 3 个时间点 C 组和 D 组的 CGRP 表达水平均显著上调($P < 0.01$)。但当联合应用外源性 NGF 时,治疗 1 周后,C、D 两组 CGRP 的表达上调水平差异明显($P < 0.01$),D 组明显低于 C 组。治疗 2 周后,CGRP 表达水平在 C 组和 D 组之间仍保持显著差异($P < 0.05$),D 组仍低于 C 组。治疗 3 周后,两组间差异明显缩小,但二者差异无统计学意义($P > 0.05$)。

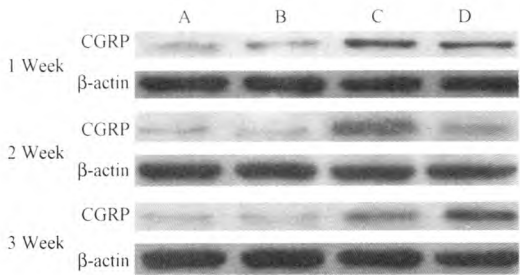


图 1 Western blot 法检测各组中 CGRP 蛋白表达。A:空白对照组;B:MSC 治疗组;C:MSC-CGRP 治疗组;D:MSC-CGRP + NGF 治疗组

Fig.1 Protein expression level of CGRP detected using Western blotting. A: Control group; B: MSCs transplantation treatment group; C: CGRP-MSCs transplantation treatment group; D: CGRP-MSCs transplantation with exogenous NGF treatment group.

表 1 Western blot 法检测各组 CGRP 蛋白表达水平比较
Table 1 Comparison of protein expression level of CGRP between each group

Time	Control group (Group A)	MSCs group (Group B)	MSC-CGRP group (Group C)	MSC-CGRP + NGF group (Group D)
One week	0.222 ± 0.024	0.206 ± 0.029	1.789 ± 0.091 *	0.896 ± 0.064 * *
Two weeks	0.135 ± 0.003	0.062 ± 0.007	0.734 ± 0.015 *	0.442 ± 0.012 * *
Three weeks	0.313 ± 0.008	0.318 ± 0.008	0.952 ± 0.202	0.805 ± 0.018 *

注:与 A 组比较, * $P < 0.01$; 与 C 组比较, * $P < 0.01$; 与 C 组比较 * $P < 0.05$
Note: * $P < 0.01$ compared to A group; * $P < 0.01$ compared to C group; * $P < 0.05$ compared to C group

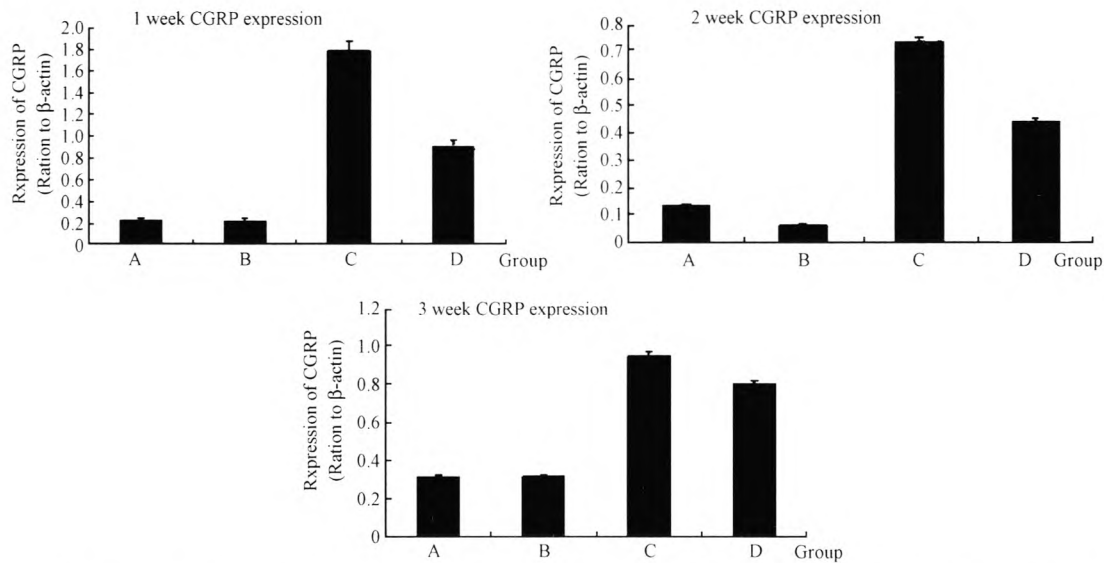


图 2 Western blot 检测各组中 CGRP 蛋白相对表达比较。A:空白对照组;B:MSC 治疗组;C:MSC-CGRP 治疗组;D:MSC-CGRP-NGF 治疗组

Fig. 2 Comparison of protein expression level of CGRP between each group. A: Control group; B: MSCs transplantation treatment group; C: CGRP-MSCs transplantation treatment group; D: CGRP-MSCs transplantation with exogenous NGF treatment group.

2.2 CGRP 基因表达水平的比较(见表 2、图 3)

实时定量荧光 PCR(相对定量法)分析,与 A 组比较,在治疗后的 3 个时间点 C 组和 D 组的 CGRP 表达均显著上调($P < 0.01$)。当联合应用外源性 NGF 时:治疗 1 周后,C 组和 D 组 CGRP 的表达上调水平差异明显($P < 0.01$),D 组明显低于 C 组。治

疗 2 周后,CGRP 表达水平在 C 组和 D 组之间仍保持显著差异($P < 0.05$),D 组仍低于 C 组。治疗 3 周后,两组间差异明显缩小,但二者差异无统计学意义($P > 0.05$),CGRP 基因和蛋白相对表达检测结果类似,差异一致。

表 2 RT 荧光 PCR 检测各组 CGRP 基因相对表达

Table 2 Changes of gene expression level of CGRP in each group

Time	Control group (Group A)	MSCs group (Group B)	MSC-CGRP group (Group C)	MSC-CGRP + NGF group (Group D)
One week	1 ± 0	1.014 ± 0.055	9.432 ± 0.395 *	5.656 ± 0.690 * #
Two weeks	1 ± 0	0.881 ± 0.035	6.518 ± 0.316 *	4.760 ± 0.170 * *
Three weeks	1 ± 0	1.002 ± 0.080	4.209 ± 0.889 *	3.301 ± 0.061 *

注:与 A 组比较, * $P < 0.01$;与 C 组比较, # $P < 0.01$;与 C 组比较 * $P < 0.05$

Note: * $P < 0.01$ compared to A group; # $P < 0.01$ compared to C group; * $P < 0.05$ compared to C group

3 讨论

骨质疏松症是一种多因素引发的疾病,其病理特征表现为骨密度与骨强度降低,临床表现为慢性疼痛与骨折风险的增加。目前普遍认为骨的成骨与破骨代谢失衡、骨细胞丢失为主要因素,因此,如何提高骨细胞的含量是目前骨质疏松症治疗研究的主要方向^[12]。Ichioka 等^[13]研究发现,骨髓干细胞移植治疗能抑制骨质疏松病程进展,新鲜的骨髓组织

可刺激造血系统受体产生大量的新鲜干细胞,并分化骨髓基质细胞,并可进一步分化为成骨细胞,促进骨细胞的形成。Takada 等^[14]则从不同的方面阐述了骨髓移植对骨质疏松的影响,新鲜的骨髓能调控骨组织中细胞因子的表达和维持骨髓造血微环境的平衡,从而有效缓解骨质疏松症状。

另一方面研究证实,神经纤维广泛分布于骨组织中,并通过多种神经因子(如神经肽、儿茶酚胺、神经营养因子)调控骨代谢活动。CGRP 是广泛存

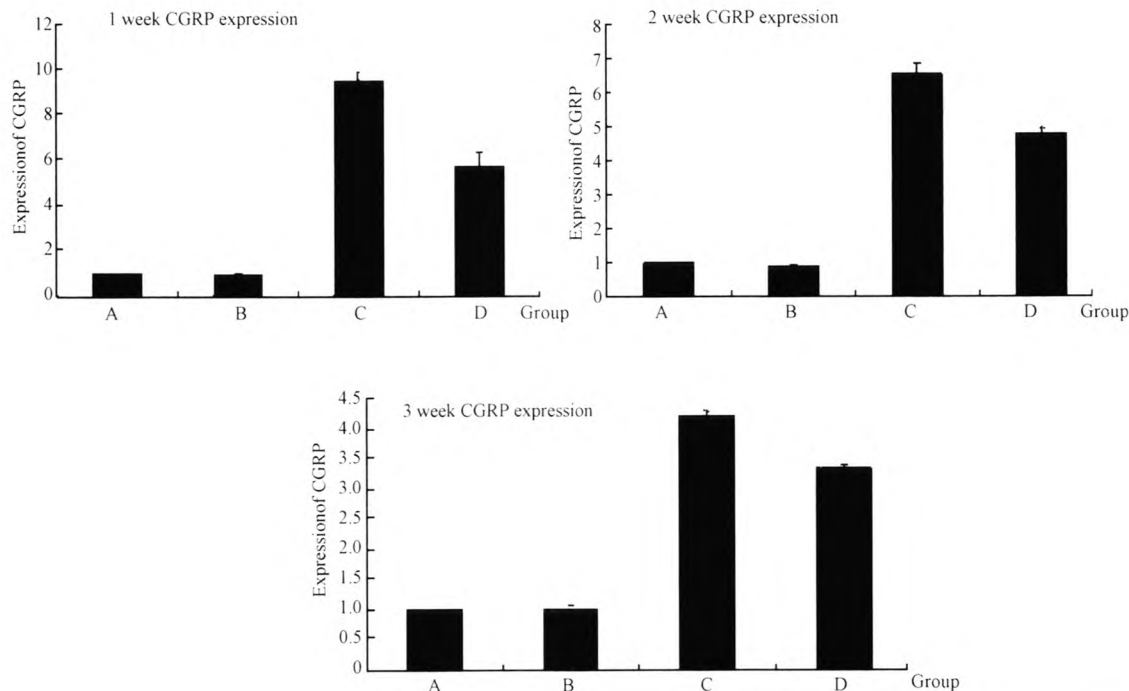


图 3 RT-PCR 检测各组中 CGRP 基因相对表达比较。A:空白对照组;B:MSC 治疗组;C:MSC-CGRP 治疗组;D:MSC-CGRP-NGF 治疗组

Fig. 3 Comparison of gene expression level of CGRP between each group. A: Control group; B: MSCs transplantation treatment group; C: CGRP-MSCs transplantation treatment group; D: CGRP-MSCs transplantation with exogenous NGF treatment group.

在于各类组织感觉神经末梢的神经肽,已被证实与骨组织中成骨与破骨细胞活动相关,尤其与破骨细胞关系密切^[15]。Villa 等^[16]指出,CGRP 能抑制骨吸收和破骨细胞分化,且可阻止粒细胞向破骨细胞分化。同时,在体外细胞学培养研究中,CGRP 可促进成骨细胞增殖与分化、及成熟,但 CGRP 在骨代谢表现出的优势可能会受限于其较少的自然存在量。Deng-W 等^[17]将 CGRP 基因导入到 MSCs 修饰后获得持续高表达、多分化、增殖强、生存潜能良好 CGRP 转基因干细胞(CGRP-MSCs),证明了 CGRP 干细胞系基因疗法在相关疾病的(例如骨质疏松症、骨修复、高血压等)前景。NGF 作为神经系统重要调控因子,对外周感觉神经和交感神经系统的发育和稳定起重要作用,并能影响骨的代谢活动。进一步研究显示在不同成骨细胞系中找到 NGF 受体并检测到 NGF 的 mRNA 表达,暗示 NGF 在骨代谢中也表现直接作用^[8]。Nakanish^[5]和 Jehan 研究均提出:成骨细胞可通过自主或旁分泌方式分泌与保存 NGF 和 NGFR(NGF 受体),诱导一系列反应包括自身磷酸化,加强成骨细胞活动^[6]。

目前 CRGP 基因转基因 MSCs 已被广泛应用各种疾病的治疗研究中,并对外源性 NGF 联合应用开

展初步研究,但在骨质疏松相关模型中未进行过类似研究。因此,在骨质疏松症的 CGRP 基因疗法中,外源性 NGF 的联合应用是否会产生累计效应、对 CGRP 表达方面具体有何影响尚无报道。本实验构建骨质疏松大鼠模型,运用不同基因疗法处理(外源性 NGF 联合应用为处理变量)。结果显示,治疗 1、2w 后,外源性 NGF 联合运用时,CGRP 相对表达水平(蛋白与基因水平)明显低于单纯转基因 CGRP-MSCs 治疗组(差异有统计学意义),3 周后,二者差异无统计学意义。本实验提示,NGF 可能通过抑制 CGRP 表达来减弱 CRGP 基因疗法在骨质疏松中的疗效。虽然本实验得到的结果与其他疾病模型中类似实验结果具有差异性,例如 Scott 学者提出外源性使用 NGF 在 CGRP 基因疗法治疗高血压模型中可提高 CGRP 表达水平^[18]。但因为在本实验之前,未曾有学者在骨质疏松模型中做过类似实验,本实验对于骨质疏松的 CGRP 基因疗法中外源性 NGF 使用的研究中仍然有重要意义。

综上所述,NGF 和 CGRP 基因疗法在骨质疏松治疗研究中均能促进骨代谢。从目前相关疾病的研究文献来看,CRGP 基因疗法与外源性 NGF 的联合应用时,很大程度上可能获得累积效应。然而,目前

的实验研究提示,外源性 NGF 联合运用在 CGRP 基因疗法治疗骨质疏松症中并未表现出有利影响,至少在 CGRP 表达层面无促进作用,而单纯的转基因 CGRP 干细胞移植治疗骨质疏松大鼠疗效优于联合应用外源性 NGF 治疗方案。本实验首次报道 CGRP 基因疗法于骨质疏松动物模型治疗中,联合应用外源性 NGF 对其疗效的影响及评价,同时考虑骨质疏松症的发病与诸多因素相关,笔者将继续完善实验方案设计,进一步深入及全面的研究骨质疏松症的 CGRP 基因疗法中,外源性 NGF 运用对 CGRP 表达及骨代谢影响,选取全面的评价指标如骨代谢计量指标测定、病理染色、骨密度检测机及生物力学测定等,从基因与蛋白表达以外的方面全面评价及比较治疗效果,通过多因素、多参数选择研究外源性 NGF 与 CGRP 基因治疗的相关影响及疗效评估,为骨质疏松的基因治疗研究提供参考。

【参 考 文 献】

- [1] Huebner AK, Keller J, Catala-Lehnen P, et al. The role of calcitonin and α -calcitonin gene-related peptide in bone formation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2008, 473 (2):210-217.
- [2] Imai S, Matsuo Y. Neuronal regulation of bone metabolism and anabolism: Calcitonin gene-related peptide-, substance P-, and tyrosine hydroxylase-containing nerves and the bone. *Microscopy Research and Technique*, 2002, 58 (2):61-69.
- [3] Lerner UH. Deletions of genes encoding calcitonin/-CGRP, amylin and calcitonin receptor have given new and unexpected insights into the function of calcitonin receptors and calcitonin receptor-like receptors in bone. *Musculoskeletal Neuronal Interact*, 2006, 6 (1):87-95.
- [4] Valentijn K, Gutow P, Rolano T. Effects of Calcitonin Gene-Related Peptide on Bone Turnover in Ovariectomized Rats. *Bone*, 1997, 21 (3):269-274.
- [5] Nakanishi T, Ohyama K, Aoki Cell. Expression of trick in a mouse osteoblastic cell line and its response to neurotrophin-3. *Bioch Biophys Res Commun*, 1997, 203 (2):1268-1274.
- [6] Jehan F, Naveilhan P, Neveu I. Regulation of NGF, BDNF and LNGFR gene expression in ROS 17/2.8 cells. *Mol Cell Endocrinol*, 2006, 116 (2):149-156.
- [7] Brian, Grirls, AlexR. Topical Application of Nerve Growth Factor Improves Fracture Healing in Rats. *Orthoepy Res*, 1997, 15 (2):235-242.
- [8] Cherruau M, Morvan FO, Schirar A, et al. Chemical sympathectomy-induced changes in TH-, VIP-, and CGRP-immunoreactive fibers in the rat mandible periosteum; Influence on bone resorption. *Journal of Cellular Physiology*, 2003, 194 (3):341-348.
- [9] Wei M, Yang Z, Li P, et al. Anti-Osteoporosis Activity of Naringin in the Retinoic Acid-Induced Osteoporosis Model. *The American Journal of Chinese Medicine*, 2007, 35 (4):663-667.
- [10] Liu CL, Qiu SJ. The cultivation and identification of mesenchymal stem cells in rats. *J Pract Med*, 2012, 5 (28):20-21.
- [11] Liu CL, Qiu SJ. Calcitonin gene related peptide construction of expression vector. *Chinese journal of tissue engineering research*, 2012, 16 (28):5246-5249.
- [12] Goldhahn J, Féron JM, Kanis J, et al. Implications for Fracture Healing of Current and New Osteoporosis Treatments: An ESCEO Consensus Paper. *Calcified Tissue International*, 2012, 90 (5):343-353.
- [13] Ichioka N, Indaba M, Kushite T, et al. Prevention of Senile Osteoporosis in SAMP6 Mice by Intracore Marrow Injection of Allogeneic Bone Marrow Cells. *Stem Cells*, 2002, 20 (6):542-551.
- [14] Takada K, Indaba M, Ichioka N, et al. Treatment of Senile Osteoporosis in SAMP6 Mice by Intra-Bone Marrow Injection of Allogeneic Bone Marrow Cells. *Stem Cells*, 2006, 24 (2):399-405.
- [15] Hara F, Amizuka N, Ozawa H. Immunohistochemical and Ultrastructural Localization of CGRP-Positive Nerve Fibers at the Epiphyseal Trabecules Facing the Growth Plate of Rat Femurs. *Bone*, 1996, 18 (1):29-39.
- [16] Villa I. CGRP inhibits osteoprotegerin production in human osteoblast-like cells via cAMP/PKA-dependent pathway. *AJP: Cell Physiology*, 2006, 291 (3):C529-C537.
- [17] Deng W, Bivalacqua TJ, Chatter goon NN, et al. Engineering Ex Vivo-Expanded Marrow Stromal Cells to Secrete Calcitonin Gene-Related Peptide Using Adenoviral Vector. *Stem Cells*, 2004, 22 (7):1279-1291.
- [18] Supowit SC, Zhao H, Dipette DJ. Nerve growth factor enhances calcitonin gene-related peptide expression in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*, 2001, 37 (2 Pt 2):728-732.

(收稿日期: 2015-04-13)