

不同浓度透明质酸水凝胶对骨形态发生蛋白 2 基因修饰的 BMSCs 特性的影响^{*}

麻凤玉^{1▲} 吴彬² 章旭² 管大凡³ 齐豹^{1▲} 孟纯阳^{2△}

(¹ 济宁医学院, 济宁 272067; ² 济宁医学院附属医院, 济宁 272029; ³ 安康市中心医院, 安康 725000)

摘要 目的 探讨不同浓度透明质酸水凝胶(hyaluronic acid hydrogel, HAH)封装携带骨形态发生蛋白 2 (bone morphogenetic protein 2, BMP-2) 基因的腺病毒载体 (Ad-BMP-2) 转染兔骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 后对细胞形态、增殖活性及蛋白表达的影响。方法 提取、培养 BMSCs; 通过成骨、成脂诱导分化及细胞表面抗原检测对 BMSCs 进行鉴定。体外制备不同浓度的 HAH 并构建携带 BMP-2 腺病毒载体转染至 BMSCs。实验分为 5 组: 0g/L HAH + Ad-BMP-2 BMSCs 组、2g/L HAH + Ad-BMP-2 BMSCs 组、4g/L HAH + Ad-BMP-2 BMSCs 组、8g/L HAH + Ad-BMP-2 BMSCs 组和 12g/L HAH + Ad-BMP-2 BMSCs 组。激光共聚焦显微镜观察不同浓度 HAH 下 Ad-BMP-2 BMSCs 的形态特征, 并进行三维重建。在第 1、2、4、6、8、10、12、14 天不同时间相点使用 CCK-8 法检测 Ad-BMP-2 BMSCs 的增殖活性; ELISA 检测各组 BMP-2 的表达情况。结果 激光共聚焦显微镜下三维重建可见 Ad-BMP-2 BMSCs 在不同浓度 HAH 中呈现不同的形态: Ad-BMP-2 BMSCs 在 2、4、8g/L HAH 中可多个方向铺展, 具有充足的生长空间, 在 12g/L HAH 中呈圆形。细胞增殖活性检测显示: 多组间细胞增殖活性比较差异性具有统计学意义 ($P < 0.05$); 4g/L HAH + Ad-BMP-2 BMSCs 组和 8g/L HAH + Ad-BMP-2 BMSCs 组增殖活性最佳。ELISA 检测 BMP-2 表达结果显示: 各组均可表达 BMP-2, 8g/L HAH + Ad-BMP-2 BMSCs 组表达 BMP-2 最高, 且与其他 4 组相比差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 不同浓度 HAH 中 Ad-BMP-2 BMSC 细胞形态、增殖活性、BMP-2 的表达均不同, 8g/L HAH 封装下具有最显著的细胞活性。

关键词 透明质酸水凝胶; 骨髓间充质干细胞; 骨形态发生蛋白 2; 组织工程

中图分类号: R318.08 文献标识码: A 文章编号: 1000-9760(2017)04-087-06

Different concentrations of hyaluronic acid hydrogels for the bone morphogenetic protein-2 gene modified BMSCs characteristics

MA Fengyu^{1▲}, WU Bin², ZHANG Xu², GUAN Dafan³, QI Bao^{1▲}, MENG Chunyang^{2△}

(¹ Jining Medical University, Jining 272067, China;

² Affiliated Hospital of Jining Medical University, Jining 272029, China;

³ Ankang City Central Hospital, Ankang 725000, China)

Abstract: Objective The different concentrations of hyaluronic acid hydrogel (HAH) encapsulated carrying bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) adenovirus vector transfection of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) and surveyed the effect on cell morphology, proliferation and protein expression. **Methods** BMSCs were extracted and cultured and identified by the use of osteogenesis and fat cell differentiation and cell surface antigen detection method. The different concentrations of HAH had been preparation in vitro. Adenovirus vector carrying BMP-2 gene were built and transfected into the BMSCs. The experiment was divided into five groups: 0g/L HAH + Ad-BMP-2 BMSCs group; 2g/L HAH + Ad-BMP-2 BMSCs group; 4g/L HAH + Ad-BMP-2 BMSCs group; 8g/L HAH + Ad-BMP-2 BMSCs group; 12g/L HAH + Ad-BMP-2 BMSCs group.

* [基金项目] 山东省自然科学基金青年基金 (ZR2014CQ042); 山东省高等学校科技计划项目 (J14LL04)

△ [通信作者] 孟纯阳, E-mail: chunyangmeng16@163.com

▲ 麻凤玉, 济宁医学院 2014 级研究生

齐豹, 济宁医学院 2015 级研究生

Laser scanning confocal microscopy at different concentrations HAH encapsulating observed the morphological characteristics Ad-BMP-2 BMSCs and the cells were been three-dimensional reconstruction. Ad-BMP-2 BMSCs proliferation activity was detected by CCK-8 assay method and ELISA method were used to detect the expression of BMP-2 in each group at 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14d. **Results** Cell morphology was built by the Three-dimensional reconstruction under the laser confocal microscopy and was different in different concentrations HAH; Ad-BMP-2 BMSCs spread out in multiple directions and had plenty of growth space in the 2, 4 and 8 g/L HAH, and cells gathered into a round shape in the 12 g/L HAH. The difference was significant statistically with comparison of the cell proliferation activity ($P < 0.05$); 4g/L HAH + Ad-BMP-2 BMSCs and 8g/L HAH + Ad-BMP-2 BMSCs had the best proliferation activity. ELISA method was used to detect the expression of BMP-2. BMP-2 could be expressed in each groups. 8g/L HAH + Ad-BMP-2 BMSCs was the highest expression of BMP-2 and compared with the other four groups, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** The different concentrations of HAH in the Ad-BMP-2 BMSC cell morphology, proliferation activity and the expression of BMP-2 had differences. Cell proliferation activity under the 8g/L HAH + Ad-BMP-2 BMSCs was the best.

Keywords: Hyaluronic acid hydrogel; Bone marrow mesenchymal stem cells; Bone morphogenetic protein-2; Tissue engineering

透明质酸水凝胶 (hyaluronic acid hydrogel, HAH) 是透明质酸与相应交联剂交联, 形成具有一定的生物相容性、可降解以及无免疫原性的水凝胶, 在再生医学领域广泛应用与研究。HAH 在包封细胞时, 可以为细胞提供三维立体生长环境, 克服了二维环境里的“接触抑制”, 同时还具有一定的机械强度, 可与细胞相互作用, 常被用于组织工程的水凝胶支架^[1]。因其在制备过程中, 不同浓度的 HAH 在包封细胞时对细胞形态及增殖活性等方面的作用具有明显差异, 特别是当被包封的细胞与 HAH 包封前经过特殊处理时 (如转染病毒、质粒、mRNA 等), 如果忽略, 最后取得的实验结果甚至可能与预期相反, 经常困扰着科研工作者。而且在骨与关节再生研究中, 骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 由于易提取、低免疫原性、多向分化潜能等具有良好应用前景^[2]; 骨形态发生蛋白 2 (bone morphogenetic protein 2, BMP-2) 是唯一经 FDA 批准用于骨移植替代的生长因子^[3]。故我们联合 HAH、BMP-2 与 BMSCs 三者构建一种新的组织工程材料, 研究其对 BMSCs 活性的影响。目前, 不同浓度 HAH 对包封未进一步处理的 BMSCs 的影响已见报道^[4], 但是关于使用 HAH 包封对进一步处理的 BMSCs 研究较少。本文采用不同浓度 HAH (2、4、8、12g/L) 包封经携带 BMP-2 基因的腺病毒载体基因修饰 BMSCs (Ad-BMP-2 BMSCs), 探讨不同浓度 HAH 下

对 Ad-BMP-2 BMSCs 细胞三维形态、增殖活性及其表达 BMP-2 的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康新西兰胎兔 4 只, 雌雄不拘, 1 月龄, 体重约 0.5kg, 购于山东省鲁抗医药股份有限公司实验动物中心。

1.1.2 试剂器材 胎牛血清、DMEM/F12 培养基 (美国 Gibco 公司); 戊巴比妥钠 (北京索莱宝公司); 小鼠抗兔 CD14-APC (德国 Miltenyi 公司); 小鼠抗兔 CD31-PE (美国 Novus Biologicals 公司); 小鼠抗兔 CD90-PE (德国 antibodies-online 公司); 小鼠抗兔 CD105-FITC (美国 GeneTex 公司); 透明质酸水凝胶试剂盒 (美国 BioTime 公司); CCK-8 试剂盒 (日本 Dojindo 公司); Ad-BMP-2 (上海汉恒生物公司); 人 BMP2 酶联免疫试剂盒 (武汉博士德生物公司)。

1.2 方法

1.2.1 BMSCs 的提取、培养、鉴定 新西兰胎兔经耳缘静脉缓慢推注 1% 戊巴比妥钠 (3.5 ml/kg), 速度约 1ml/min。通过呼吸、角膜反射判断麻醉深度。然后取侧卧位, 双侧髂前上棘备皮、消毒、铺巾; 经左侧髂前上棘抽取兔骨髓液 3~5 ml, 依序抽取另一侧。将骨髓液与 PBS 等比例混合, 将稀释的骨髓液轻轻滴加在等量的 Percoll 分离液上

方,水平离心 30min (2500r/min),溶液分 4 层,吸取乳白色单核细胞层,将提取的细胞用 DMEM/F12 培养基(含 1% 青-链霉素、10% 胎牛血清)重悬,转移至培养瓶(25cm²),换液,通过选择性消化进行传代,期间通过倒置荧光相差显微镜进行观察 BMSCs 生长状态。培养至第三代进行成骨、成脂诱导分化,同时另取第三代细胞按照抗体说明书分别加入抗兔 CD14、CD31、CD90、CD105 抗体进行流式细胞检测;另取同批细胞分别进行同型对照。

1.2.2 最佳感染复数(multiplicity of infection, MOI)值的确定 取第三代 BMSCs,细胞计数后,转移至六孔板(10⁶/孔),12h 后换液,每孔加入 1/2 体积的培养基,然后按照 MOI 值分别为 50、80、100、120、200 的 Ad-BMP-2 加入到六孔板中,每种 MOI 值设 3 个复孔,4~6h 后换液,24h 后上流式细胞仪检测感染效率以及细胞生存率,确定最佳 MOI 值。

1.2.3 不同浓度 HAH 的制备及包封 HAH 试剂盒包括经巯基修饰的透明质酸(HyStemTM)、聚乙二醇二丙烯酸酯(ExtralinkTM)和脱气去离子水 3 个组分;将脱气去离子水按照试剂盒说明书加入 HyStemTM、ExtralinkTM中,分别配成 2、4、8、12g/L 的 HAH;然后分别将提前准备好的 Ad-BMP-2 BMSCs 使用水凝胶进行重悬。

1.2.4 不同浓度下 Ad-BMP-2 BMSCs 细胞三维形态观察 将上面制备的不同浓度的 HAH 与 Ad-BMP-2 BMSCs 重悬后,移植到预先经多聚赖氨酸包埋的盖玻片上,待 HAH 凝固后加入细胞培养基培养,24h 后将构建好的材料用 4% 多聚甲醛进行固定,PBS 洗涤干燥后,树胶封片,置于激光共聚焦显微镜下对细胞形态进行观察。

1.2.5 细胞增殖活性检测 将用不同浓度 HAH 包封 Ad-BMP-2 BMSCs 后的混合物,在凝胶之前分别加入 8 块 96 孔板中(100μl/孔),每种浓度 HAH 设 3 个复孔;对照组为没有包封 HAH 的 Ad-BMP-2 BMSCs,同时对于每种浓度的 HAH 分别设置没有包封 Ad-BMP-2 BMSCs 的作为阴性对照,每孔加入 200μl 培养基后放入 CO₂ 恒温细胞培养箱培养。分别于第 1、2、4、6、8、10、12、14 天不同时间点根据

CCK-8 说明书检测 Ad-BMP-2 BMSCs 的增殖活性。

1.2.6 ELISA 检测 BMP-2 的表达 借助于上一步,在每个时间点检测 CCK-8 法前,将细胞上清液收集至 EP 管中,-20℃ 保存,待 14d 收集完细胞上清液后,根据 ELISA 试剂盒的说明书对细胞上清液中的 BMP-2 的表达进行检测。

1.3 统计学方法

数据采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计学处理,数据使用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,方差齐性检验后组间两两比较用 LSD-*t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BMSCs 的培养及鉴定

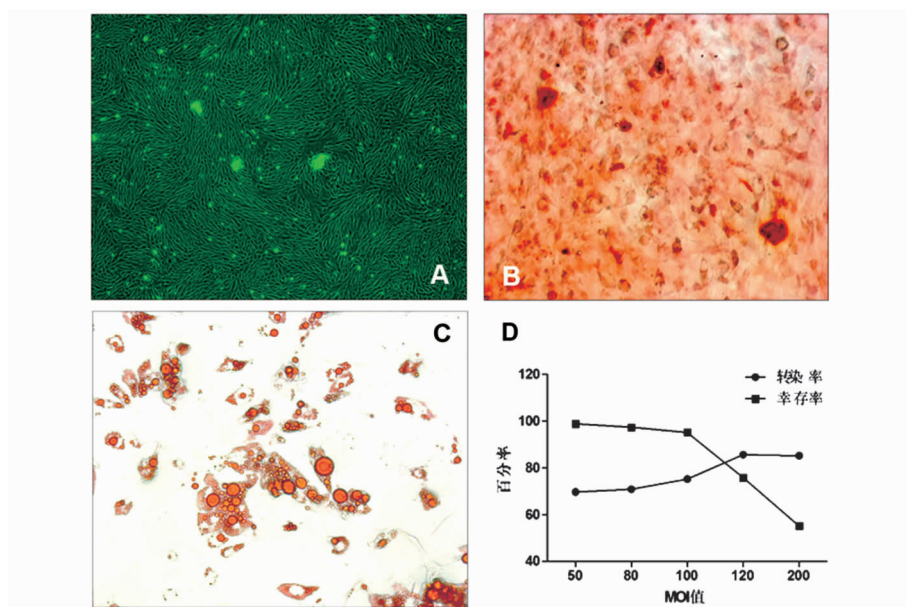
倒置显微镜下观察原代单个细胞形态呈典型梭形,生长至 80%~90% 融合时呈旋风样分布。培养至第三代,诱导分化为成骨细胞、脂肪细胞。流式细胞仪细胞表面分子标志结果显示:BMSCs 低表达 CD31、CD14,高表达 CD90、CD105。细胞形态、分化特性、细胞表面分子标志结果均符合 BMSCs 特性。见图 1。

2.2 Ad-BMP-2 的 MOI

以不同的 MOI 值的 Ad-BMP-2 转染 BMSCs,24h 后流式细胞仪检测细胞表达绿色荧光蛋白(green fluorescent protein,GFP)所占的比例作为转染效率,结果显示 MOI 值为 50、80、100、120、200 时,转染率分别为 69.68%、70.87%、75.21%、85.69%、85.21%;细胞生存率分别为 98.87%、97.43%、95.24%、75.85%、55.23%。当 MOI 值超过 100 时,转染率增加不明显,但 BMSCs 生存率明显下降,故 BMSCs 最佳 MOI 值为 100(图 1 D)。

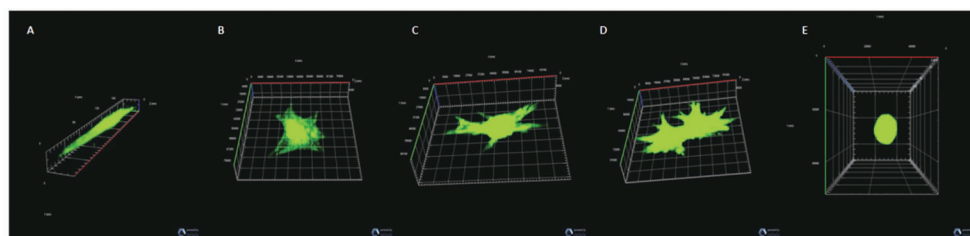
2.3 不同浓度 HAH 包封下的 Ad-BMP-2 BMSCs 细胞三维形态

激光共聚焦显微镜下三维重建可见 Ad-BMP-2 BMSCs 在不同浓度 HAH 中呈现不同的形态;Ad-BMP-2 BMSC 在 0g/L HAH 包封下呈长梭形,2g/L、4g/L 和 8g/L HAH 包封下向多个方向铺展,具有充足生长空间、在 12g/L HAH 包封下呈类圆形。见图 2。



注:A为原代 BMSCs(×50);B为 BMSCs 定向诱导为成骨细胞(茜素红染色,×200);
C为 BMSCs 定向诱导为脂肪细胞(油红染色,×200);D为 Ad-BMP-2 最佳感染复数(MOI)

图1 BMSCs 的培养及鉴定



注:A-E 分别为不同浓度 HAH(0、2、4、8、12g/L) 包封下 Ad-BMP-2 BMSCs 形态(×200)

图2 激光共聚焦显微镜三维重建不同浓度 HAH 包封下的 Ad-BMP-2 BMSCs 形态

2.4 不同浓度 HAH 包封下的 Ad-BMP-2 BMSCs 细胞增殖活性

CCK-8 法结果显示 1~3d 为生长稳定期,从第 4 天后进入对数生长期,之后由于生存环境差异,分别于第 6 天、第 8 天后进入平台期。将多个组的增殖能力进行比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$);随将 8g/L 组与 0g/L 组、2g/L 组、12g/L 组相比,增殖能力均有差异($P < 0.05$),但与 4g/L 组相比差异无统计学意义($P > 0.05$);8g/L 组的增殖能力最优,明显优于其他各组,且对数生长期持续时间最长。见图 3。

2.5 BMP-2 的表达

ELISA 检测细胞上清液 BMP-2 的表达,结果显示各组均可正常表达 BMP-2,各组间比较差异具有统计学意义($P < 0.05$),4 g/L 组与 8 g/L 组

BMP-2 的表达略高于 0 g/L 组、2 g/L 组和 12 g/L 组,其中 2 g/L 组 BMP-2 表达量最低,考虑与 HAH 浓度太低,BMSCs 不能有效黏附在材料中生长,大多数 BMSCs 仍贴壁生长于 96 孔板底部有关。见图 4。

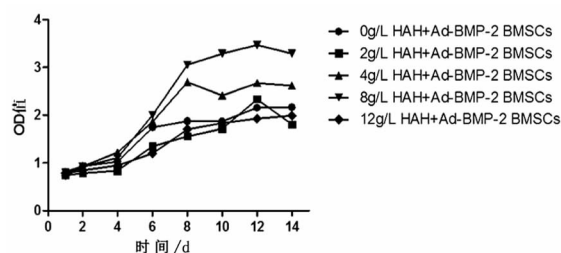
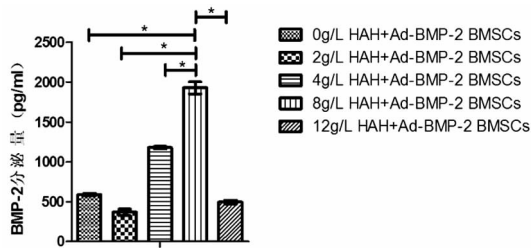


图3 不同浓度 HAH 包封下的 Ad-BMP-2 BMSCs 细胞增殖活性



注:与 8g/LHAH + Ad-BMP-2 BMSCs 组相比, * $P < 0.05$

图 4 不同浓度 HAH 封装下 BMP-2 的分泌量

3 讨论

透明质酸是组织细胞外基质的主要成分之一,由于其固有的生物相容性、可降解性、无免疫原性、可协助机体保持水分及润滑关节等特性,在再生医学领域得到广泛应用。由于透明质酸构建的水凝胶支架又常被用做细胞生长和组织修复的良好媒介,在组织工程被公认为是一种理想生物材料^[1]。

HAH 主要成分是透明质酸,不同性质的透明质酸对细胞的作用差异很大。高分子量的透明质酸具有抗炎^[5]、抗血管形成的作用^[6];而低分子量的透明质酸具有促进炎症反应、促进血管生成的作用^[7]。在其构成的 HAH 上,主要研究的是不同浓度的 HAH 封装携带 BMP-2 腺病毒载体转染兔 BMSCs 后对细胞形态及增殖能力的影响。BMP-2 属于转化生长因子超家族,在美国已被批准应用于临床^[3],具有刺激骨再生,影响骨代谢。BMP-2 具有诱导 BMSCs 分化为软骨细胞、成骨细胞,引起众多学者的兴趣。但 BMP-2 是由 26kb 大小的两个相同单体构成的二聚体蛋白多糖,直接注入体内或局部应用存在半衰期短、弥散障碍等缺陷,限制了其广泛应用。为此,研究者在这方面进行了多种探索,Liu 等^[8]在研究 BMP-2 刺激 BMSCs 分化及成骨时发现,BMP-2 可被结合到多聚物支架上,并允许可控释放,但支架材料结合 BMP-2 的量有限。Xu 等^[9]将 BMP-2 结合到透明质酸水凝胶纳米粒子上也可实现可控释放,但同样克服不了纳米粒子结合有限 BMP-2 的问题。近年来,随着基因工程、组织工程的发展,将目的基因通过载体转染到种子细胞中短期或永久表达,联合细胞支架,构建出一种新的组织工程材料,应用于再生医学研究领域已成为一种趋势。BMSCs 来源于骨髓间质,具有取材方便、体外生长迅速、多向分化潜能等优点,使其在组织工程构建中成为一种非常有前景的种子细胞。另外作者已通过基因修饰使 BMP-2 在 BM-

SCs 中表达^[10],在此基础上,我们将 Ad-BMP-2 封装于不同浓度的 HAH 中,研究 HAH 对细胞形态、增殖能力以及 BMP-2 表达的影响。

本实验中,体外提取兔 BMSCs,培养、鉴定以及转染提前构建好的携带 BMP-2 的腺病毒载体,并构建了 4 种不同浓度的 HAH,封装携带 BMP-2 腺病毒载体转染兔 BMSCs。在细胞形态上,通过激光共聚焦三维重建我们发现在 2、4、8g/L HAH 封装下可向多个方向铺展,有充足生长空间,在 12g/L HAH 封装下呈圆形。说明不同浓度的 HAH,为细胞提供的网孔大小不同,BMSCs 呈现不同的形态特征。细胞增殖活性在不同浓度的 HAH 封装下,8g/L 的 HAH 增殖能力最好,明显优于其他各组,且对数生长期持续时间最长($P < 0.05$)。另外在 8g/LHAH 封装下的 BMP-2 表达量优于其他各组($P < 0.05$)。

综上所述,在不同浓度 HAH 封装下携带 BMP-2 腺病毒载体转染兔 BMSCs 后,在 8g/L 的 HAH 封装下 Ad-BMP-2 BMSCs 在材料中可充分铺展、细胞增殖活性最好并可表达目的蛋白。但本实验未对 HAH 的浓度进行更详细的构建以及未对不同浓度 HAH 封装携带 BMP-2 腺病毒载体转染兔 BMSCs 后进行较长时间(如 20、30d)的研究评估。因此,在 HAH 封装下关于经过基因修饰的 BMSCs 细胞形态、增殖活性及目的蛋白表达方面还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Lei Y, Gojini S, Lam J, et al. The spreading, migration and proliferation of mouse mesenchymal stem cells cultured inside hyaluronic acid hydrogels[J]. *Biomaterials*, 2011, 32 (1): 39-47. DOI: 10. 1016/j. biomaterials. 2010. 08. 103.
- [2] Huang YC, Leung VY, Lu WW, et al. The effects of microenvironment in mesenchymal stem cell-based regeneration of intervertebral disc[J]. *Spine J*, 2013, 13 (3): 352-362. DOI:10. 1016/j. spinee. 2012. 12. 005.
- [3] Belykh E, Giers M, Bardanova L, et al. The role of bone morphogenetic proteins 2, 7, and 14 in approaches for intervertebral disk restoration[J]. *World Neurosurg*, 2015, 84 (4): 871-873. DOI:10. 1016/j. wneu. 2015. 08. 011.
- [4] 李凯, 吕少一, 周建业, 等. 不同浓度透明质酸水凝胶的细胞相容性[J]. *中国组织工程研究*, 2013, 17 (16): 2927-2934. DOI: 10. 3969/j. issn. 2095-4344.

2013. 16. 011.
- [5] Day AJ, de la Motte CA. Hyaluronan cross-linking; a protective mechanism in inflammation [J]. Trends Immunol, 2005, 26 (12) : 637-643. DOI: 10. 1016/j. it. 2005. 09. 009.
- [6] West DC, Kumar S. Hyaluronan and angiogenesis [J]. Ciba Found Symp, 1989, 143: 187-201; discussion 201-7, 281-285. DOI: 10. 1002/9780470513774. ch12.
- [7] West DC, Hampson IN, Arnold F, et al. Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid [J]. Science, 1985, 228 (4705) : 1324-1326. DOI: 10. 1126/science. 2408340.
- [8] Liu HW, Chen CH, Tsai CL, et al. Heterobifunctional poly (ethylene glycol)-tethered bone morphogenetic protein-2-stimulated bone marrow mesenchymal stromal cell differentiation and osteogenesis [J]. Tissue Eng, 2007, 13 (5) : 1113-1124. DOI: 10. 1089/ten. 2006. 0209.
- [9] Xu X, Jha AK, Duncan RL, et al. Heparin-decorated, hyaluronic acid-based hydrogel particles for the controlled release of bone morphogenetic protein 2 [J]. Acta Biomater, 2011, 7 (8) : 3050-3059. DOI: 10. 1016/j. actbio. 2011. 04. 018.
- [10] Zhang C, Liu HM, Li QW, et al. Construction of recombinant adenovirus vector containing hBMP2 and hVEGF165 genes and its expression in rabbit Bone marrow mesenchymal stem cells [J]. Tissue Cell, 2014, 46 (5) : 311-317. DOI: 10. 1016/j. tice. 2014. 06. 001.
- (收稿日期 2016-12-13)
(责任编辑: 石俊强)

+++++
(上接第 81 页)

- [23] Allen DB, Backeljauw P, Bidlingmaier M, et al. GH safety workshop position paper: a critical appraisal of recombinant human GH therapy in children and adults [J]. Eur J Endocrinol, 2016, 174 (2) : P1-P9. DOI: 10. 1530/EJE-15-0873.
- [24] 李鑫, 班博, 乔建敏, 等. 重组人生长激素治疗生长激素缺乏症儿童引发肿瘤相关性的 Meta 分析 [J]. 中国儿童保健杂志, 2017, 25 (1) : 55-58. DOI: 10. 11852/zgthjzz 2017-25-01-06.
- [25] Bell J, Parker KL, Swinford RD, et al. Long-term safety of recombinant human growth hormone in children [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2010, 95 (1) : 167-177. DOI: 10. 1210/jc. 2009-0178.
- (收稿日期 2017-04-11)
(责任编辑: 林琳)

+++++
(上接第 86 页)

- [26] Folsom JJ, Begcy K, Hao X, et al. Rice fertilization-Independent Endosperm1 regulates seed size under heat stress by controlling early endosperm development [J]. Plant Physiol, 2014, 165 (1) : 238-248. DOI: 10. 1104/pp. 113. 232413.
- [27] Eckert C, Offenborn JN, Heinz T, et al. The vacuolar calcium sensors CBL2 and CBL3 affect seed size and embryonic development in Arabidopsis thaliana [J]. Plant J, 2014, 78 (1) : 146-156. DOI: 10. 1111/tpj. 12456.
- [28] Hirsch CN, Flint-Garcia SA, Beissinger TM, et al. Insights into the effects of long-term artificial selection on seed size in maize [J]. Genetics, 2014, 198 (1) : 409-421. DOI: 10. 1534/genetics. 114. 167155.
- [29] Yu F, Li J, Huang Y, et al. FERONIA receptor kinase controls seed size in Arabidopsis thaliana [J]. Mol Plant, 2014, 7 (5) : 920-922. DOI: 10. 1093/mp/ssu010.
- [30] Li N, Li Y. Maternal control of seed size in plants [J]. J Exp Bot, 2015, 66 (4) : 1087-1097. DOI: 10. 1093/jxb/eru549.
- [31] Kou C, Gao X, Li LQ, et al. Composition and Selection of TaGW2-6A Alleles for Wheat Kernel Weight [J]. Acta Agronomica Sinica, 2015, 41 (11) : 1640. DOI: 10. 3724/sp. j. 1006. 2015. 01640.
- [32] Qin L, Hao C, Hou J, et al. Homologous haplotypes, expression, genetic effects and geographic distribution of the wheat yield gene TaGW2 [J]. BMC Plant Biol, 2014, 14: 107. DOI: 10. 1186/1471-2229-14-107.
- [33] Hong Y, Chen L, Du LP, et al. Transcript suppression of TaGW2 increased grain width and weight in bread wheat [J]. Funct Integr Genomics, 2014, 14 (2) : 341-349. DOI: 10. 1007/s10142-014-0380-5.
- [34] Kim K H, Shin S H, Lee HS, et al. Relationship between pre-harvest sprouting and functional markers, TaVp-1A, TaSdr-B1 and TaPHS1 in Korean wheat cultivars [J]. Research on Crops, 2014, 15 (3) : 604. DOI: 10. 5958/2348-7542. 2014. 01384. 9.
- (收稿日期 2016-12-09)
(责任编辑: 林琳)