

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.10.002

网络首发 http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20181228.0846.006.html(2018-12-29)

## EZH2 对神经干细胞增殖的调控及其机制研究\*

王 希<sup>1</sup>, 黄昌钊<sup>1</sup>, 高 峰<sup>1</sup>, 何 鹏<sup>1</sup>, 王锐英<sup>1</sup>, 高 燕<sup>2△</sup>

(1. 桂林医学院附属医院四肢创伤骨外科, 广西桂林 541001;

2. 桂林医学院附属医院护理学院, 广西桂林 541001)

**[摘要]** **目的** 探究 Zeste 基因增强子同源物 2(EZH2)对体外培养的神经干细胞增殖的调控作用及潜在机制。**方法** 采取第 3~6 代正常人神经干细胞,分别利用慢病毒构建稳转细胞株: EZH2 基因过表达细胞(OV-EZH2)及对照细胞(OV-Control)、EZH2 基因 shRNA 敲降细胞(sh-EZH2)及对照细胞(sh-Control)。CCK-8 法和 EdU 染色法检测 4 种细胞的活力,流式细胞术检测细胞周期及凋亡,Western blot 和实时荧光定量聚合酶链反应(qPCR)检测相关蛋白表达水平。**结果** 与 OV-Control 细胞相比,OV-EZH2 细胞 48、72、96 h 时细胞增殖水平上调,且差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与 sh-Control 细胞相比,sh-EZH2 细胞在 48、72、96 h 时细胞增殖水平下调,且差异有统计学意义( $P < 0.05$ );EZH2 基因敲降造成细胞周期阻滞在 G<sub>1</sub> 期( $P < 0.05$ ),而 OV-EZH2 加速细胞进入细胞周期 S 和 G<sub>2</sub> 期( $P < 0.05$ );EZH2 干扰或过表达对细胞凋亡无明显影响( $P > 0.05$ );同时,与 OV-Control 细胞相比,OV-EZH2 细胞增殖相关蛋白 CyclinD1 和 c-Myc 蛋白表达水平上调,且差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论** EZH2 基因能够通过促进 CyclinD1 和 c-Myc 蛋白表达水平上调,促进神经干细胞的增殖。

**[关键词]** 神经系统;干细胞;细胞增殖;细胞周期;EZH2**[中图分类号]** R681 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)10-1625-05

## Role and mechanism of EZH2 in the proliferation of neural stem cells\*

WANG Xi<sup>1</sup>, HUANG Changzhao<sup>1</sup>, GAO Feng<sup>1</sup>, HE Peng<sup>1</sup>, WANG Ruiying<sup>1</sup>, GAO Yan<sup>2△</sup>

(1. Department of Orthopaedics, Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin,

Guangxi 541001, China; 2. College of Nursing, Affiliated Hospital of Guilin Medical

University, Guilin, Guangxi 541001, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the proliferative effect and mechanism of EZH2 on neural stem cells (NSCs) in vitro. **Methods** The third to sixth passage normal NSCs were adherent cultured. Lentivirus was used to construct stable cell lines: EZH2 overexpression cells (OV-EZH2), control cells (OV-Control), EZH2 shRNA knockdown cells (sh-EZH2) and control cells (sh-Control). Cell viability was detected by CCK-8 and EdU assay. Cell cycle and apoptosis were measured by flow cytometry. Western blot and qPCR were used to detect the expression of related proteins. **Results** Compared with the OV-Control cells, OV-EZH2 significantly promotes the proliferation of NSCs ( $P < 0.05$ ). Meanwhile, compared with the sh-Control cells, sh-EZH2 significantly decreased the proliferation of NSCs ( $P < 0.05$ ). sh-EZH2 resulted in G<sub>1</sub>/S phase delay ( $P < 0.05$ ), and OV-EZH2 accelerated cells to S and G<sub>2</sub> phase transition ( $P < 0.05$ ). Nevertheless, EZH2 knockdown and overexpression exhibited no effect on the apoptosis of NSCs. Compared with OV-Control cells, OV-EZH2 significantly increased the expression of Cyclin D1 and c-Myc ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** EZH2 may promote proliferation of NSCs through Cyclin D1 and c-Myc pathway.

**[Key words]** nervous system; stem cells; proliferation; cell cycle; EZH2

神经干细胞(neural stem cells, NSCs)是指存在于神经系统中,能分化为包括神经元细胞在内的多种细胞的一类细胞,能进行自我更新<sup>[1]</sup>。NSCs 的发现和移植为解决脊髓损伤等疾病后神经元病理性减少

及神经元间靶联中断提供了可能<sup>[2]</sup>。干细胞移植可通过减少二次级联细胞的损伤,增强体内内源性神经干细胞的自我更新(即增殖),从而补充功能受损的神经干细胞群<sup>[3]</sup>。因此,调控和提高 NSCs 的增殖至关

重要。Zeste 基因增强子同源物 2 (EZH2) 是 PcG 基因家族的基因之一,能够调控基因的表达,EZH2 被发现能够促进胚胎干细胞、肿瘤细胞的增殖和转移<sup>[4]</sup>。并且 EZH2 在增殖的 NSCs 中高度表达<sup>[5]</sup>。但 EZH2 基因在 NSCs 增殖中的作用尚不清楚。本研究通过在人神经干细胞 (hNSCs) 中过表达和敲降 EZH2 基因的表达,来探究 EZH2 基因和 NSCs 增殖之间的联系。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 人神经元干细胞购自美国 ScienCell 公司。细胞培养基及胎牛血清购自美国 Gibco 公司;引物、EZH2 敲降慢病毒和过表达慢病毒及其各自对照慢病毒购自上海汉恒生物科技有限公司;CCK8 细胞增殖检测试剂盒和 EdU 检测试剂盒购自海门市碧云天公司;细胞周期及凋亡流式检测试剂盒购自日本东仁化学公司;胰蛋白酶、双抗、二甲基亚砷 (DMSO) 购自美国 Sigma 公司;EZH2、Cyclin D1、c-Myc 鼠源单克隆抗体、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记山羊抗小鼠 IgG 二抗购自美国 Cell Signaling 公司;甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 鼠源单克隆抗体购自美国 Proteintech 公司;生物安全柜及细胞培养箱购自美国 Thermo Fisher 公司;倒置荧光显微镜购自日本 OLYMPUS 公司;酶标仪购自美国 bio-tek EL 公司;流式细胞检测仪购自美国 BD 公司;凝胶电泳系统购自美国 Bio-Rad 公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 神经干细胞的培养** 应用含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基,在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 及饱和湿度条件下进行细胞培养,待细胞长至对数生长期时进行细胞传代。

**1.2.2 4 种神经干细胞稳转株构建** 4 种慢病毒(过表达对照慢病毒 OV-Control,过表达慢病毒 OV-EZH2;shRNA 对照慢病毒 sh-Control,shRNA 干扰慢病毒 sh-EZH2)转染前 18~24 h,将贴壁细胞铺到细胞培养板中。待细胞贴壁且生长至 50% 左右融合度时用含有 6 μg/mL polybrene 的新鲜培养基替换原培养基,加入适量病毒悬液。37 °C 孵育。继续培养 24 h,用新鲜培养基替换含有病毒的培养基。72 h 后,加入 2 μg/mL Puromycin,每隔 2 天重新换液加入药物,持续观察 14 d 左右,直至显微镜下观察荧光细胞比例为 100% (比例 = GFP 阳性细胞数/总细胞数)。随后取一部分细胞用以收取蛋白和 RNA,以检测过表达和敲降效率。

**1.2.3 实时荧光定量聚合酶链反应 (qPCR) 检测基因表达** 每孔细胞加入 TRIzol 1 mL。将样品在室温 (15~30 °C) 放置 5 min,使核酸蛋白复合物完全分离;每使用 1 mL TRIzol 加入 0.2 mL 氯仿,剧烈振荡 15 s,室温放置 3 min;2~8 °C,10 000×g 离心

15 min。样品分为 3 层:底层为黄色有机相,上层为无色水相和一个中间层。RNA 主要在水相中,水相体积约为所用 TRIzol 试剂的 60%;把水相转移到新管中,用异丙醇沉淀水相中的 RNA;每使用 1 mL TRIzol 加入 0.5 mL 异丙醇,室温放置 10 min;2~8 °C,10 000×g 离心 10 min,移去上清液;用 75% 乙醇洗涤 RNA 沉淀。每使用 1 mL TRIzol 至少加 1 mL 75% 乙醇。2~8 °C,7 500×g 转速以内,离心 5 min,弃上清液;室温放置干燥 RNA 沉淀,加入 25~200 μL 无 RNase 的水,用枪头吸打几次,55~60 °C 放置 10 min 使 RNA 溶解,-80 °C 保存。反转录反应程序:37 °C 60 min,85 °C 5 min,4 °C 5 min,置于-20 °C 保存。将制备好的 cDNA 进行 PCR 扩增,扩增体系如下:SYBRGreen Mix 12.5 μL,上游引物 (正向) 0.5 μL,下游引物 (反向) 0.5 μL,双蒸水 (ddH<sub>2</sub>O) 9.5 μL,cDNA 模板 2.0 μL,总体积 25.0 μL。反应程序:95 °C 10 min;95 °C 15 s,60 °C 45 s,循环 40 次;95 °C 15 s,60 °C 1 min,95 °C 15 s,60 °C 15 s;数据采用仪器自带软件分析:ABI Prism 7300 SDS Software。引物序列,正向:AAT CAG AGT ACA TGC GAC TGA GA;反向:GCT GTA TCC TTC GCT GTT TCC。

**1.2.4 Western blot 检测蛋白表达** 细胞的培养、分组及处理同上。蛋白裂解液提取细胞总蛋白,用二辛酸硫酸铜 (BCA) 试剂盒测定蛋白浓度。随后进行蛋白定量和变性,应用 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳,120 V 恒定电压在分离胶中电泳 60 min,在 300 mA 恒定电流下应用聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜进行转膜 90 min,洗膜液 (TBST) 洗膜 3 遍后,使用 5% 牛奶封闭非特异性结合位点,封闭结束后,于 4 °C 进行一抗 (1:1 000 稀释) 中孵育过夜,TBST 洗 3 遍之后,加入 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗 (1:2 000 稀释) 室温中孵育 2 h,TBST 洗膜后,加入化学发光剂 (ECL) 反应并利用化学发光成像仪检测。

**1.2.5 CCK8 检测细胞增殖** 细胞培养于 6 孔板,按照基因干扰阴性对照组 (sh-Control)、基因干扰组 (sh-EZH2)、基因过表达对照组 (OV-Control)、基因过表达组 (OV-EZH2) 分别对细胞进行对应慢病毒转染,慢病毒转染 24 h 后,直接配置含 10% CCK8 的培养基,以换液的形式加入。37 °C 孵育 0.5 h,将孵育后的上清液转移至 96 孔板,酶标仪测定 450 nm 处吸光度;Hank's 平衡盐溶液 (HBSS) 润洗细胞 3 次,加入培养基继续培养至 48、96 h,重复上述实验内容,绘制细胞生长曲线。

**1.2.6 EdU 掺入法检测细胞增殖** 用细胞培养基稀释 EdU 溶液 (培养基:试剂 A=1 000:1),制备适量 50 μmol/L 的 Edu 培养基;每孔加入 100 μL 50

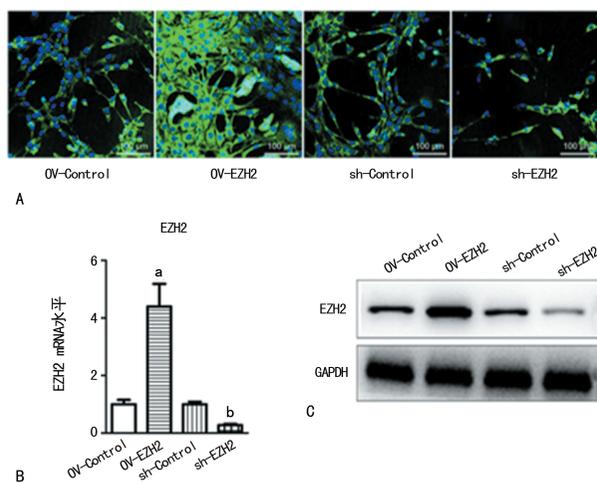
$\mu\text{mol/L}$  EdU 培养基孵育 1 h, 弃培养基; 磷酸盐缓冲液(PBS)清洗细胞 2 次, 每次 5 min; 每孔加入  $100\ \mu\text{L}$  4% 多聚甲醛细胞固定液, 室温孵育 30 min; 每孔加入 2 mg/mL 甘氨酸, 脱色摇床孵育 5 min 后, 弃甘氨酸溶液; 每孔加入  $100\ \mu\text{L}$  PBS, 脱色摇床清洗 5 min, 弃 PBS; 每孔加入  $100\ \mu\text{L}$  渗透剂(0.5% Triton X-100 的 PBS)脱色摇床孵育 10 min; PBS 清洗 1 次, 5 min; 每孔加入  $100\ \mu\text{L}$  的 1 mg/mL 4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI), 避光、室温、脱色摇床孵育 10 min, 弃染色反应液; 每孔每次加入  $100\ \mu\text{L}$  PBS 清洗 1~3 次; 染色完成后, 荧光显微镜拍照。

**1.2.7 流式检测细胞周期和凋亡** 细胞接种于 6 孔板, 按照基因敲降阴性对照组(sh-Control)、基因敲降组(sh-EZH2)、基因过表达对照组(OV-Control)、基因过表达组(OV-EZH2) 4 组细胞培养 48 h 后, 0.25% 胰酶消化收集细胞, 并用 1 mL PBS 清洗剩余细胞 1 次, 全部加入 15 mL 管中。800 r/min 离心 5 min, 去除上清液, 加 5 mL PBS 重悬细胞, 再次离心弃上清液, 重复 2 次, 最后重悬细胞于 0.1 mL PBS 中, 并转移到 1.5 mL 离心管中。对于细胞周期检测, 按照 1:100 加入碘化丙啶(PI)染液, 置于垂直混合液上室温孵育 1 h。对于细胞凋亡检测, 每样品中分别加入  $5\ \mu\text{L}$  PI 染液和  $5\ \mu\text{L}$  磷脂结合蛋白(Annexin-V-FITC)染液, 置于垂直混合液上室温孵育 30 min, 1 500 r/min 离心 5 min, 去除上清液, 加 1 mL PBS 重悬细胞, 再次  $800\times g$  离心 5 min, 弃上清液, 重复 3 次, 最后将洗好的细胞重悬于 0.2 mL PBS 中。用锡箔纸包住避光, 将细胞加入流式管中, 在 BD 流式细胞仪上分析。

**1.3 统计学处理** 所有数据分析均使用 SPSS18.0 统计软件。以上所有的体外试验至少重复 3 次。对于基因相对表达分析, 对照组的平均值定义为 1。计量资料以  $\bar{x}\pm s$  表示, 使用 *t* 检验进行两组的比较。以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

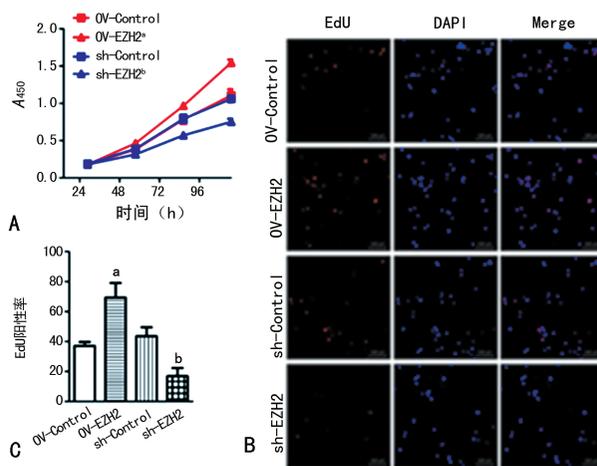
**2 结 果**

**2.1 过表达和敲降稳转株的构建及鉴定** 4 种慢病毒转染 NSCs 后, 利用嘌呤霉素进行药物筛选, 14 d 后, 细胞 GFP 阳性率达到 100%(图 1A)。同时, 实验结果显示, 相较于 OV-Control 组, OV-EZH2 mRNA EZH2 的表达水平上调 400% 以上, 且差异有统计学意义( $P<0.05$ , 图 1B), 相较于 sh-Control 组, sh-EZH2 组 EZH2 mRNA 表达水平下调至 30% 以下, 且差异有统计学意义( $P<0.05$ , 图 1B)。Western blot 得到一致的实验结果(图 1C)。



A: 细胞 GFP 荧光显微镜拍照( $\times 40$ ); B: EZH2 基因 mRNA 表达水平鉴定( $n=4$ ); C: EZH2 基因蛋白表达水平鉴定; <sup>a</sup>:  $P<0.05$ , 与 OV-Control 组比较, <sup>b</sup>:  $P<0.05$ , 与 sh-Control 组比较

**图 1 EZH2 基因过表达和敲降细胞稳转构建鉴定**



A: 过表达和敲降细胞 EZH2 基因, CCK8 检测细胞活力( $n=4$ ); B: 试剂盒检测神经干细胞中 EdU 阳性率, 激光共聚焦拍照( $\times 40$ ); C: 神经干细胞中 EdU 阳性率统计图( $n=4$ ); <sup>a</sup>:  $P<0.05$ , 与 OV-Control 组比较, <sup>b</sup>:  $P<0.05$ , 与 sh-Control 组比较

**图 2 敲降或过表达 EZH2 对神经干细胞增殖的影响**

**2.2 过表达或敲降 EZH2 对 NSCs 增殖的影响** 实验结果显示, 对比 OV-Control 组, OV-EZH2 组 24、48、72 h 时细胞增殖活力上调, 差异有统计学意义( $P<0.05$ , 图 2A)。OV-EZH2 组 EdU 阳性率( $69.21\pm 9.86\%$ )高于 OV-Control 组( $37.00\pm 2.70\%$ ), 差异有统计学意义( $P<0.05$ , 图 2B、C)。相较于 sh-Control 组, sh-EZH2 组 24、48、72 h 时细胞增殖活力显著下调( $P<0.05$ , 图 2A), 且 sh-EZH2 组细胞 EdU 阳性率( $16.83\pm 5.53\%$ )比 sh-Control 组( $43.52\pm 5.99\%$ )显著下调( $P<0.05$ , 图 2B、C)。

**2.3 过表 EZH2 或干扰 EZH2 表达对 NSCs 细胞周期的影响** 实验结果显示, 相较于基因敲降阴性对照组(sh-Control), EZH2 干扰(sh-EZH2)组细胞处于  $G_1$  期细胞比例显著上调(图 3、表 1,  $P<0.05$ ), 而 S 期和  $G_2$  期细胞比例显著降低(图 3、表 1,  $P<0.05$ )。

反过来, 研究中利用慢病毒对 EZH2 基因进行过表达, 相较于对照组 (OV-Control), 在 NSCs 中 EZH2 过表达后 (OV-EZH2),  $G_1$  期细胞比例显著下降 (图 3、表 1,  $P < 0.05$ ), 而 S 期和  $G_2$  期细胞比例显著上升 (图 3、表 1,  $P < 0.05$ )。

**2.4 体外过表达 EZH2 或沉默 EZH2 表达对 NSCs 凋亡的影响** 研究结果显示, EZH2 干扰组和 EZH2 过表达组与其各自对照组相比, OV-Control 组凋亡率为 (5.97 ± 0.15)%, OV-EZH2 组凋亡率为 (5.71 ± 0.27)%, 两者之间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); sh-Control 组凋亡率为 (5.74 ± 0.19)%, sh-EZH2 组凋

亡率为 (5.41 ± 0.31)%, 且两组间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 见图 4。

表 1 过表 EZH2 或干扰 EZH2 表达对神经干细胞细胞周期的影响 ( $n = 4, \bar{x} \pm s, \%$ )

组别	$G_1$	S	$G_2$
OV-Control 组	79.36 ± 1.16	11.52 ± 0.57	6.06 ± 0.58
OV-EZH2 组	68.09 ± 0.88 <sup>a</sup>	19.28 ± 1.20 <sup>a</sup>	11.59 ± 1.42 <sup>a</sup>
sh-Control 组	78.24 ± 1.36	11.49 ± 0.81	6.82 ± 0.53
sh-EZH2 组	89.19 ± 0.98 <sup>b</sup>	5.00 ± 0.62 <sup>b</sup>	2.86 ± 0.43 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与 OV-Control 组比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与 sh-Control 组比较

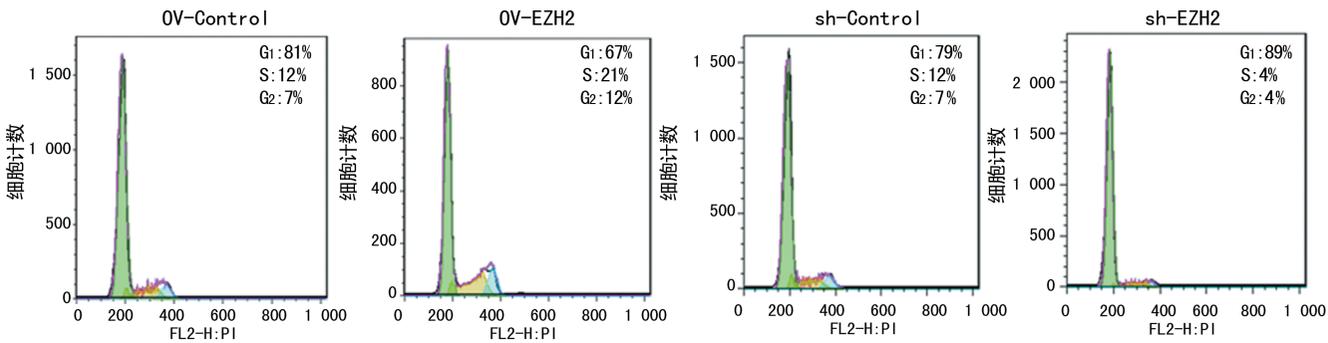


图 3 过表 EZH2 或干扰 EZH2 表达对 NSCs 细胞周期的影响

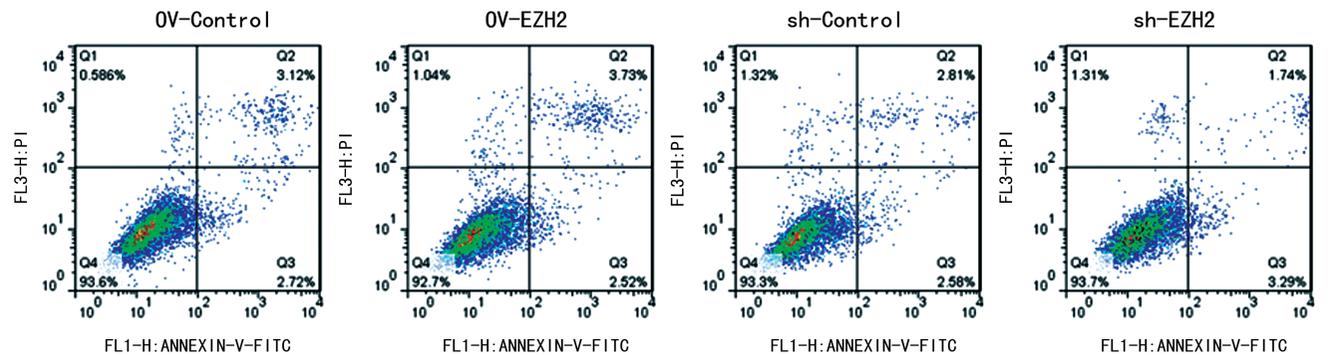
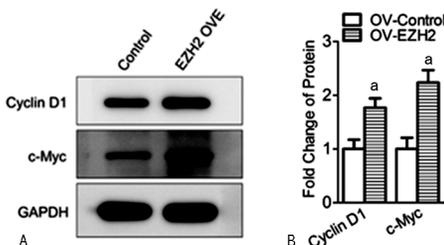


图 4 体外过表达 EZH2 或沉默 EZH2 表达对 NSCs 凋亡的影响

**2.5 在 NSCs 中过表达 EZH2 能上调 CyclinD1 和 c-Myc 蛋白表达** 通过 Western blot 发现, 过表达 EZH2 基因 ( $P < 0.05$ ) 之后, Cyclin D1 和 c-Myc 蛋白的表达水平也随之上调, 且差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见图 5。

3 讨论

NSCs 移植是临床上将 NSCs 移植到宿主体内, 使 NSCs 向相关病变部位聚集并增殖存活, 进而分化为神经功能细胞, 达到神经系统疾病治疗目的的方法。近年来, NSCs 研究成为治疗诸如脊髓损伤等神经系统疾病的热点手段<sup>[6]</sup>。但是, 胚胎性 NSCs 可自动发生分化, 具有无限增殖能力, 移植至患者体内有致瘤的可能<sup>[7]</sup>。另外移植的环境可能与 NSCs 原本的生存条件不同, 不利于 NSCs 的存活及分化<sup>[8]</sup>。因此如何控制 NSCs 的增殖, 既能保证移植细胞的存活率和自我更新能力, 又能控制其增殖速度和分化时间节点, 是目前该治疗手段亟待解决的问题。因而本研究采取慢病毒手段, 在 NSCs 中稳定过表达和敲降 EZH2 基因的表达, 对其在 NSCs 增殖中的作用及其机制进行研究, 意图寻找到调控 NSCs 移植中控制细胞增殖和分化的钥匙。



A: Western blot 实验代表图; B: Western blot 条带灰度统计分析图; <sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与 OV-Control 组比较;  $n = 4$

图 5 EZH2 基因过表达对 Cyclin D1 和 c-Myc 蛋白表达水平的影响

EZH2 作为 PCR2 的催化亚基,能抑制转录,进而影响到下游重要的信号通路,在染色体水平调节基因活性,在干细胞的更新与维持中发挥重要作用<sup>[9-10]</sup>。有研究观察到,NSCs 向不同方向增殖分化时,EZH2 表达水平存在明显差异<sup>[11-12]</sup>:增殖的 NSCs 中高度表达,在 NSCs 向神经元细胞分化时,EZH2 表达水平降低,在 NSCs 向星形胶质细胞分化时,EZH2 表达完全停止,在 NSCs 向少突胶质细胞分化过程中,从少突胶质前体细胞分化到不成熟少突胶质细胞期间,EZH2 维持高水平表达<sup>[13]</sup>。在本研究中,成功过表达和干扰 EZH2 基因的表达之后,分别能够促进和抑制 NSCs 的增殖,影响细胞进入细胞周期的速度,而对细胞凋亡水平并未见显著影响;因而设法调节移植 NSCs 中 EZH2 基因的表达可以起到调控 NSCs 增殖的作用。另外,进一步的研究还发现,过表达 EZH2 基因,能够促进增殖相关蛋白 Cyclin D1 和 c-Myc 的表达,这可能是其调控细胞增殖潜在的分子机制,而具体的信号途径还需要进一步的分析研究。

本实验结果表明,EZH2 能够在体外调控 NSCs 的增殖,为临床细胞学治疗脊髓损伤及相关疾病提供了实验依据。

## 参考文献

[1] GHANBARI A, ESMAEILPOUR T, BAHMANPOUR S, et al. Depletion of neural stem cells from the subventricular zone of adult mouse brain using cytosine b-Arabinofuranoside[J]. *Brain Behav*, 2015, 5(11): e00404.

[2] LEE I S, JUNG K, KIM I S, et al. Human neural stem cells alleviate Alzheimer-like pathology in a mouse model[J]. *Mol Neurodegener*, 2015, 10: 38.

[3] 杨坦, 刘华, 王肇光, 等. 应用于缺血缺氧性脑病治疗的神经干细胞移植: 现实与未来[J]. *中国组织工程研究*, 2014, 18(1): 143-148.

[4] 陈德桂. 靶向 Ezh2 的肿瘤干细胞治疗策略[J]. *生命科学*, 2016, 28(8): 928-932.

[5] ZHANG J, JI F, LIU Y, et al. Ezh2 regulates adult hippocampal neurogenesis and memory[J]. *J Neurosci*, 2014, 34(15): 5184-5199.

[6] ZHANG T, QIAN H, HU C, et al. MiR-26a mediates ultraviolet B-Induced apoptosis by targeting histone methyltransferase EZH2 depending on Myc expression [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 43(3): 1188-1197.

[7] 陈晓丽, 李少川, 陈久智, 等. 神经干细胞治疗脊髓损伤的研究近况[J]. *中国医药生物技术*, 2017, 12(5): 424-428.

[8] DOOLEY D, VIDAL P, HENDRIX S. Immunopharmacological intervention for successful neural stem cell therapy: new perspectives in CNS neurogenesis and repair [J]. *Pharmacol Ther*, 2014, 141(1): 21-31.

[9] 张宝华, 仇福成, 董慈, 等. 脑脊液途径移植神经干细胞治疗中枢神经系统疾病的研究现状[J]. *中国组织工程研究*, 2014, 18(6): 974-978.

[10] WANG S, WENG C, XU H, et al. Effect of optogenetic stimulus on the proliferation and cell cycle progression of neural stem cells[J]. *J Membr Biol*, 2014, 247(6): 493-500.

[11] LEE Y, CHANG W, CHEN Y, et al. Hsp90 alpha mediates BMI1 expression in breast cancer stem/progenitor cells through facilitating nuclear translocation of c-Myc and EZH2 [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(9): 1986.

[12] HWANG W, SALINAS R, SIU J, et al. Distinct and separable roles for EZH2 in neurogenic astroglia[J]. *Elife*, 2014, 3(1): e02439.

[13] AKIZU N, GARCIA M, ESTARAS C, et al. EZH2 regulates neuroepithelium structure and neuroblast proliferation by repressing p21[J]. *Open Biol*, 2016, 6(4): 150227.

(收稿日期:2018-08-18 修回日期:2018-12-03)

(上接第 1624 页)

[5] 亓鹏. 温敏型生物降解水凝胶载体防龋基因疫苗不同途径免疫 SD 大鼠的实验研究[D]. 遵义: 遵义医学院, 2011.

[6] YU F, XU Q A, CHEN W. A targeted fimA DNA vaccine prevents alveolar bone loss in mice after intra-nasal administration[J]. *J Clin Periodontol*, 2011, 38(4): 334-340.

[7] 于飞, 朱光勋, 陈卫民. 靶向牙周炎 DNA 疫苗免疫原性及免疫效能的实验研究[J]. *临床口腔医学杂志*, 2011, 27(7): 387-389.

[8] GIBSON F C 3rd, GENCO C A. Prevention of Porphyromonas gingivalis-induced oral bone loss following immunization with gingipain R1[J]. *Infect Immun*, 2001, 69(12): 7959-7963.

[9] SHIMADA A, KOBAYASHI T, ITO S, et al. Expression of anti-Porphyromonas gingivalis peptidylarginine deiminase immunoglobulin G and peptidylarginine deiminase-4 in patients with rheumatoid arthritis and periodontitis[J].

*J Periodontol Res*, 2016, 51(1): 103-111.

[10] WANG S, LIU H, ZHANG X, et al. Intranasal and oral vaccination with protein-based antigens: advantages, challenges and formulation strategies[J]. *Protein Cell*, 2015, 6(7): 480-503.

[11] 吕朋君, 李桂红, LYU P G, 等. 可溶性抗血凝素和麦芽糖结合蛋白经鼻黏膜免疫诱导慢性牙周炎的抗体产生[J]. *国际免疫学杂志*, 2014, 37(3): 255-259.

[12] HIROI T, YANAGITA M, OHTA N, et al. IL-15 and IL-15 receptor selectively regulate differentiation of common mucosal immune system-independent B-1 cells for IgA responses[J]. *J Immuno*, 2000, 165(8): 4329-4337.

[13] 王丹阳, 杨雨, 杨秀梅, 等. PolyI : C 协同 IL-15 作为小鼠卵透明带 3 基因疫苗佐剂黏膜免疫效果的观察[J]. *中国生物工程杂志*, 2015, 35(9): 7-13.

(收稿日期:2018-08-18 修回日期:2018-11-25)