

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.14.002

# 人羊膜和牙周膜来源间充质干细胞免疫表型与干性标志基因表达的比较分析\*

陈 辉<sup>1,2</sup>, 杨 琨<sup>3</sup>, 蒋珊珊<sup>1</sup>, 林凤琴<sup>1,2</sup>, 何 青<sup>1,2</sup>, 方 宁<sup>1,2</sup>, 余丽梅<sup>1,2△</sup>

(1. 遵义医科大学附属医院贵州省细胞工程重点实验室/贵州省羊膜与骨髓间充质干细胞基础与临床研究科技创新团队, 贵州遵义 563003; 2. 遵义医科大学贵州省生物治疗人才基地, 贵州遵义 563003; 3. 遵义医科大学附属口腔医院牙周科, 贵州遵义 563003)

**[摘要]** **目的** 研究羊膜和牙周膜来源间充质干细胞的免疫表型及干性基因表达的异同。**方法** 取羊膜和牙周膜各 3 例, 采用酶消化法分离细胞并进行细胞传代培养, 获取第 3 代人羊膜间充质干细胞(hAMSCs)与人牙周膜干细胞(hPDLSCs), 流式细胞术检测分子免疫表型, 实时定量 PCR 检测干性标志基因表达水平。**结果** 原代培养的 hAMSCs 生长速度快于 hPDLSCs, 后者形态均一; 第 2、3 代细胞均生长良好, 每 3 天可传代 1 次, 第 3 代 hAMSCs 和 hPDLSCs 都为均一的长梭形, 呈漩涡状排列, 均高表达 CD90、CD73、CD105 和 CD44, 表达百分率高于 98%; hAMSCs 的 CD34、CD19、CD45、CD11b、人类白细胞抗原 DR(HLA-DR) 总阳性表达率低于 hPDLSCs ( $P < 0.05$ )。两种干细胞均不表达/低表达 Sox2 mRNA, 而 Nanog、Oct4 和 C-myc mRNA 呈中高水平表达, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。**结论** hAMSCs 和 hPDLSC 具有相似的形态特征和免疫表型, 且干性基因表达无明显差异, hAMSCs 的免疫原性可能更低, 应用前景较大。

**[关键词]** 间充质基质细胞; 羊膜; 牙周组织; 免疫表型分型; 干性基因

**[中图分类号]** R319

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2020)14-2249-06

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



## Comparative analysis of the immunophenotypes and expression of stemness marker genes in human mesenchymal stem cells derived from human amniotic membrane and periodontal ligament \*

CHEN Hui<sup>1,2</sup>, YANG Kun<sup>3</sup>, JIANG Shanshan<sup>1</sup>,LIN Fengqin<sup>1,2</sup>, HE Qing<sup>1,2</sup>, FANG Ning<sup>1,2</sup>, YU Limei<sup>1,2△</sup>

(1. Key Laboratory of Cell Engineering in Guizhou Province/the Guizhou Province Foundation and Clinical Research Technology Innovation Team on Amniotic and Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi, Guizhou 563003, China; 2. Guizhou Biotherapy Talent Base, Zunyi Medical University, Zunyi, Guizhou 563003, China; 3. Department of Periodontology, Hospital of Stomatology, Zunyi Medical University, Zunyi, Guizhou 563003, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore the similarities and differences of immunophenotypes and expression of stemness marker genes in mesenchymal stem cells derived from amniotic membrane and periodontal ligament. **Methods** Three samples of amniotic membrane and periodontal ligament were taken. The third generation of human amniotic mesenchymal stem cells (hAMSCs) and human periodontal ligament stem cells (hPDLSCs) were obtained by pancreatin digestion and subculture. The flow cytometry was used to detect cellular molecular immunophenotype, and the real-time quantitative PCR was used to detect the expression level of stem cell marker genes. **Results** The growth rate of primary cultured hAMSCs was faster than that of hPDLSCs, and the latter was homogeneous in morphology. The second and third generations cells all grew well, and could be subcultured once every three days. The third generation hAMSCs and hPDLSCs were both uniformly long spindle-shaped cells that arranged in a spiral pattern. The positive expression percentages of CD90, CD73, CD105 and CD44 were all higher than 98% in the third generation hAMSCs and hPDLSCs. The total positive expression rate of CD34<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> of hAMSCs was lower than that of

\* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81260507、81760199); 贵州省科技厅科技重大专项〔黔科合重大专项〕字(2011)6002}。

作者简

介: 陈辉(1989—), 助理研究员, 硕士, 主要从事细胞分析学与干细胞生物学研究。△ 通信作者, E-mail: ylm720@sina.com。

hPDLSCs, and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). The hAMSCs and hPDLSCs did not express or express low level of Sox2, while Nanog, Oct4 and C-myc mRNA were expressed at medium to high levels, and there was no significant difference between them ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** hAMSCs and hPDLSC have similar morphological features and immunophenotypes, and there is no significant difference in expression of stem cell markers. Compared to hPDLSC, hAMSCs have lower immunogenicity, which will be widely used.

**[Key words]** mesenchymal stromal cells; amnions; periodontium; immunophenotyping; stemness cell marker gene

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs) 因具有来源广泛、易扩增、低免疫原性、多向分化、免疫调节、旁分泌等多种特征和功能而被广泛应用于造血干细胞移植、自身免疫性疾病以及心、肝、脑、肺、肾、骨、关节、脊髓、胰腺等组织器官损伤修复等治疗, 在动物实验和临床研究中都显示了良好的疗效, 同时也作为组织工程技术的种子细胞、药物活性筛选或药物载体被开发利用<sup>[1-4]</sup>。目前, 研究最多的 MSCs 主要来源于骨髓、脂肪、脐带、尿液、羊膜、牙周膜、牙髓脐血等<sup>[5]</sup>。体内外研究表明, MSCs 在特定条件下可定向分化为心肌、肝细胞、肾小管上皮细胞、成骨细胞、软骨细胞、神经细胞、胰岛细胞等, 替代损伤的组织器官功能细胞<sup>[6-9]</sup>; 配合造血干细胞移植, 还可改善造血微环境, 提高造血干细胞移植成功率, 减轻移植物抗宿主病<sup>[10]</sup>; 在肝损伤、脊髓损伤、膝骨关节炎的治疗中, MSCs 的作用机制还涉及抗炎, 分泌白细胞介素-10、胰岛素样生长因子-1、肝细胞生长因子、血管内皮生长因子等细胞因子和多种 miRNA, 促进血管和损伤组织再生等<sup>[11]</sup>。然而, 不同组织来源 MSCs 的生物学特性既存在诸多的相似性, 也具有不同之处。以往的研究表明, 人羊膜 MSCs (human amniotic MSCs, hAMSCs) 较骨髓 MSCs 而言, 明显具有伦理限制小、可无创取材、细胞增殖能力强、免疫原性低、原始和扩增数量级高等突出优势<sup>[11]</sup>。尽管 hAMSCs 治疗的临床应用还有待进一步确证, 但可能在未来组织工程技术发展中具有更诱人的应用前景。人牙周膜干细胞 (human periodontal ligament stem cells, hPDLSCs) 在成体取材的创伤和风险远小于骨髓 MSCs, 二者都同样来源于废弃组织, 具有伦理争议低、来源广泛等特点, 且在成软骨方面要强于牙髓来源 MSCs, 能够形成致密规整的软骨细胞团, 可作为牙再生的种子细胞<sup>[12-13]</sup>。因此, 本研究主要从免疫表型和干性标准基因表达两个方面比较了羊膜和牙周膜来源 MSCs 的异同, 为进一步合理利用干细胞资源治疗不同疾病奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂与仪器

碱性成纤维细胞生长因子 (b-FGF, 美国 Pepro-Tech 公司), 低糖 DMEM (L-DMEM) 培养基、胎牛血清 (以色列 Biological Industries 公司),  $\alpha$ -MEM 培养

基、胶原酶 I、胶原酶 II 和胰酶 (美国 Gibco 公司), Human MSCs 分析试剂盒 (美国 BD Bioscience 公司), 藻红蛋白 (PE) 标记的 CD105 (CD105-PE, 美国 Beckman Coulter 公司), RNAiso Plus、PrimeScript™ RT 试剂盒、TB Green™ Premix Ex Taq™ (大连 Takara 公司); CO<sub>2</sub> 培养箱、7500 定量 PCR 仪 (美国 Applied Biosystems 公司); DMIRB 倒置荧光显微镜 (德国 Leica 公司), Moflo XDP 流式细胞仪 (美国 Beckman Coulter 公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 hAMSCs 的分离和培养

经知情同意后, 采集甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒和获得性免疫缺陷病毒及梅毒螺旋体血清学检测阴性者的足月分娩胎盘, 无菌条件下剥离羊膜, 参考文献和本实验室已建立的方法<sup>[11,14]</sup>。采用二酶消化法, 分离 hAMSCs, 以补充了 0.1 ng/mL b-FGF、10% 胎牛血清 L-DMEM 完全培养基悬浮细胞, 按  $1 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> 的密度接种 hAMSCs 于 25 cm<sup>2</sup> 细胞培养瓶中, 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养; 第 3 天更换培养基, 至细胞生长至瓶底面积 80% 左右, 采用 0.125% 胰酶 [含 0.02% 乙二胺四乙酸 (EDTA)] 消化细胞, 以  $1 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> 的密度传代培养, 至第 3 代, 用于后续实验, 倒置相差显微镜下观察细胞形态和生长状态。

#### 1.2.2 hPDLSCs 的分离和培养

经知情同意后, 采集 12~18 岁青少年患者 (无牙周炎症) 因正畸需要拔除的双侧上、下颌健康前磨牙。拔出后立即用无菌生理盐水冲洗, 并置于 15 mL 装有含 1% 双抗的  $\alpha$ -MEM 培养基的离心管中, 转移到超净工作台; 再次冲洗至液体清亮, 无菌刀片刮取根中 1/3 的牙周膜组织, 加入 0.3% I 型胶原酶 37 °C 恒温摇床消化 30 min, 含 10% 胎牛血清  $\alpha$ -MEM 完全培养基终止消化; 800 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 完全培养基 2 mL 重悬细胞沉淀, 接种于 6 孔板, 置入 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中, 每 3 天换液 1 次, 至细胞生长至瓶底面积 60% 时, 用 0.125% 胰酶消化、传代, 取第 3 代细胞进行实验。

#### 1.2.3 流式细胞术分析细胞免疫表型

PBS 重悬终止消化的第 3 代 MSCs, 调整细胞密度为  $(3 \sim 5) \times 10^6$  cells/mL, 分为 7 管, 每管 100  $\mu$ L

细胞悬液,按照 Human MSCs 分析试剂盒和 CD105 抗体说明书分别加入异硫氰酸荧光素标记的 CD90 (CD90-FITC),藻蓝蛋白标记的 APC (CD73-APC), CD44-PE,CD105-PE,PE 标记的 CD34、CD45、CD11b、CD19,人类白细胞抗原 DR(HLA-DR)抗体及其同型对照,室温避光孵育 25 min,加入 2 mL 含 2% FBS 的 PBS 溶液洗涤,1 000 r/min 离心 6 min,重复洗涤 1 次,300  $\mu$ L 含 2% 多聚甲醛的固定液重悬细胞,采用 Moflo XDP 流式细胞仪进行检测,KALUZA 软件分析 MSCs 表型分子表达的百分率。

**1.2.4 实时荧光定量 PCR(RT-PCR)检测干性基因表达水平**

取终止消化的指数生长期第 3 代干细胞,PBS 洗涤 2 次,将细胞沉淀溶于 1 mL RNAiso Plus 中,参照试剂说明书提取总 RNA,经 Nanodrop 2000C 浓度测定仪测定 RNA 浓度,调整反转录模板量为 1  $\mu$ g,参照 PrimeScript™ RT 试剂盒说明书 37  $^{\circ}$ C 15 min,85  $^{\circ}$ C 5 s 进行逆转录;使用 TB Green™ Premix Ex Taq™ 试剂盒进行 Sox2、Oct4、Nanog、C-myc 4 种干性标志基因及内参基因 GAPDH 的定量 PCR 扩增,引物序列见表 1。PCR 反应条件:94  $^{\circ}$ C 5 min,94  $^{\circ}$ C 15 s,60  $^{\circ}$ C 30 s,40 个循环,并添加溶解曲线分析步骤,计算目的基因的相对表达水平<sup>[15]</sup>。

**1.3 统计学处理**

采用统计软件 SPSS17.0 进行统计分析,计量资料  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用两独立样本 *t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 细胞生长与形态观察**

hAMSCs 原代培养 24~48 h 逐渐贴壁,7~10 d 细胞铺至瓶底面积达到 80% 左右,除可见梭形细胞外,还含有少量多角形或卵圆形细胞,传代培养时每 3 天传代 1 次,至第 3 代时,为均一、贴壁生长良好的长梭形细胞,呈旋涡状排列(图 1A、B),传代生长至 7 代,均生长形态良好,9~10 代细胞生长明显缓慢,形态变宽,并出现多角形细胞。hPDLSCs 原代培养 3 d 左右,从组织块周边开始爬行长出长梭形或多角形细胞,15~20 d 细胞融合度达到 60%,培养至第 2 代后每 3 天传代 1 次(图 1C、D),7 代以内,细胞形态良好。

**2.2 免疫表型变化**

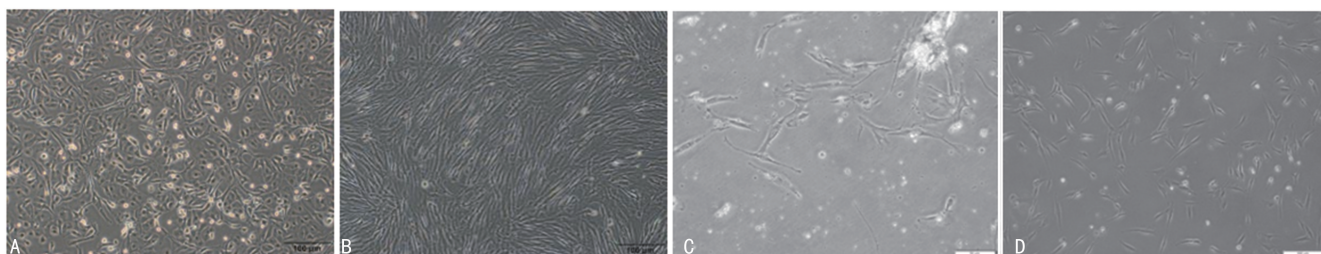
流式细胞术检测传代培养至第 3 代 hAMSCs 和 hPDLSCs 的分子免疫表型,表达百分率结果显示,两种干细胞均高表达 CD90、CD73、CD105 和 CD44,阳性表达率高于 98%,均不表达或极低地表达 CD34、CD45、CD11b、CD19 和 HLA-DR,表达率总和均低于 2%(图 2)。hAMSCs 和 PDMSCs 表达的前 4 个阳性标志免疫表型分子具有较好的一致性,但 hPDLSCs 的 CD34<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> 阳性表达率高于 hAMSCs( $P < 0.05$ ),见表 2。

**2.3 4 个干性基因 mRNA 表达水平**

体外培养至第 3 代的 hAMSCs 和 hPDLSCs 的 4 个干性基因相对表达水平见表 3,两种干细胞 Sox2、Oct4、C-myc 和 Nanog 基因 mRNA 表达水平均无明显差异,其中 Sox2( $33.9 < Ct < 36.1$ )呈现不表达/低表达,而 C-myc( $21.1 < Ct < 23.1$ )、Oct4( $26.9 < Ct < 27.5$ )和 Nonog( $29.3 < Ct < 30.6$ )基因为中高水平表达,Nonog 和 Oct4 表达水平较为接近。

表 1 定量 PCR 扩增引物序列

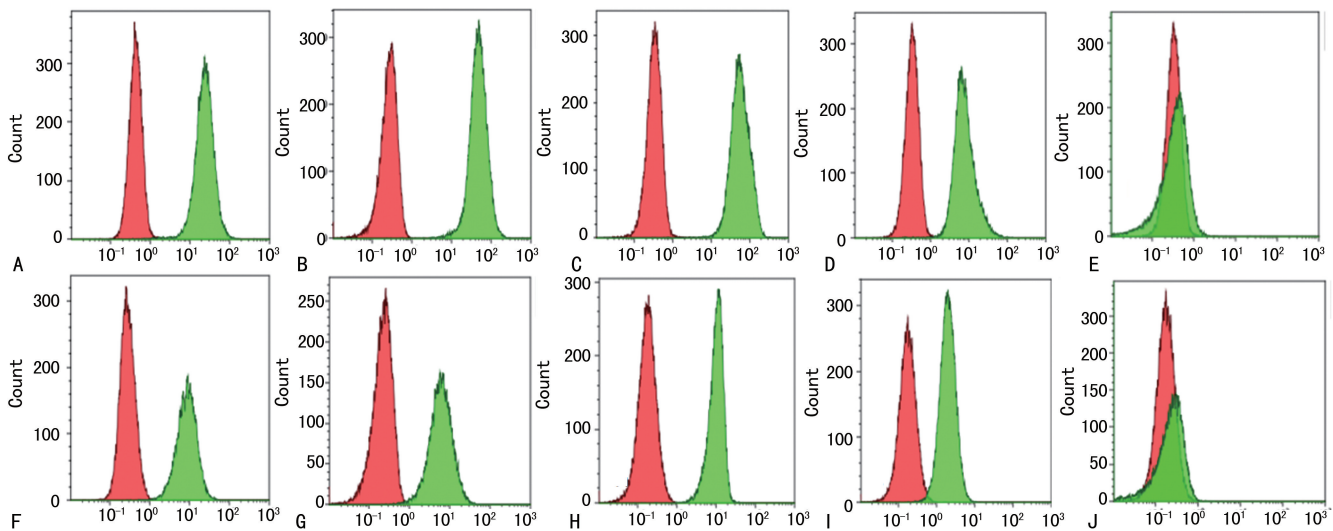
基因	GenBank ID	Primer F(5'-3')	Primer R(5'-3')	长度(bp)
Sox2	NM_003106.3	GCCGAGTGGAAACTTTGTGTCG	GGCAGCGTGTACTTATCCTTCT	155
Nanog	NM_024865.3	AATCCTTCCTCTCCCCTCCT	AGGCTCCAACCATACTCCAC	121
Oct4	NM_112957.3	CGAGAGGATTTTGAGGCTGC	CGAGGAGTACAGTGCAGTGA	126
C-myc	NM_002467.6	AACACACAACGTCTTGAGGC	GCACAAGAGTTCCGTAGCTG	246
GAPDH	NM_002046.7	CCAAGGAGTAAGACCCTGG	AGGGGAGATTTCAGTGTGGTG	117



A:hAMSCs 原代细胞形态;B:hAMSCs 第 3 代细胞形态;C:hPDLSCs 原代细胞形态;D:hPDLSCs 第 3 代细胞形态。

图 1 hAMSCs 和 hPDLSCs 原代及第 3 代细胞生长形态比较( $\times 100$ )





A~E:hAMSCs;F~J:hPDLSCs;A,F:CD90<sup>+</sup>;B,G:CD73<sup>+</sup>;C,H:CD44<sup>+</sup>;D,L:CD105<sup>+</sup>;E,J:CD34<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>。

图 2 hAMSCs 和 hPDLSCs 的分子免疫表型流式检测分析图

表 2 流式检测 hAMSCs 和 hPDLSCs 的分子免疫表型阳性表达率比较 ( $n=3, \bar{x} \pm s, \%$ )

组别	CD90 <sup>+</sup>	CD73 <sup>+</sup>	CD105 <sup>+</sup>	CD44 <sup>+</sup>	CD34 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup> CD45 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup>
hAMSCs	99.88±0.04	98.80±0.03	98.15±1.76	99.64±0.01	0.02±0.01
hPDLSCs	99.72±0.33	99.72±0.33	99.79±0.19	99.91±0.11	0.33±0.06*

\*:  $P < 0.05$ , 与 hAMSCs 比较。

表 3 hAMSCs 和 hPDLSCs 4 个干性基因的 mRNA 相对表达水平比较 ( $n=3, \bar{x} \pm s, \times 100\%$ )

组别	Sox2	Oct4	C-myc	Nanog
hPDLSCs	114.98±24.04	86.58±26.73	110.89±15.44	150.10±60.76
hAMSCs	67.33±13.30	76.25±4.94	78.04±6.94	84.34±4.97

### 3 讨论

从细胞培养中观察到的细胞增殖和保持良好形态特征来看, hAMSCs 较 hPDLSCs 原代培养增殖速度快, 目前的培养体系扩增代数较多, 加之 hAMSCs 原始数量级可高达  $1 \times 10^8$  个细胞<sup>[11]</sup>, 这也可能是 hAMSCs 在大规模扩增和高数量级需求的细胞治疗及组织工程技术的应用中具有明显优势。

自 2006 年国际细胞治疗协会提出骨髓 MSCs 的最低鉴定标准后, 参照这一标准对不同来源的 MSCs 也进行了免疫表型分子表达分析, 通常要求 CD90、CD73、CD44、CD105 的阳性表达百分率需大于 95%, 而 CD34、CD19、CD45、CD11b 及 HLA-DR 阳性表达的总和需小于 2%<sup>[16-18]</sup>, 但尚缺乏对不同来源 MSCs 表达上述分子水平的比较研究。CD90<sup>+</sup> 被认为是造血干细胞 CD34<sup>+</sup> 一样的干细胞多能性标志物。CD105 是细胞表面的 I 型膜糖蛋白, 在血管生成中起着至关重要的作用。CD45、CD34、CD11b 和 CD19 阳性表达则用来排除白细胞、造血祖细胞、内皮细胞、单核细胞和巨噬细胞及 B 淋巴细胞的标志分子。HLA-DR 是人白细胞抗原复合物编码的 MHC II 类细胞表面受体, 是免疫原性的标志物。95% 以上的 hAMSCs

和 hPDLSCs 均高表达 CD90、CD73、CD44 和 CD105, 仅不足 1% 的细胞表达 CD34、CD45、CD11b、CD19 和 HLA-DR, 显示出与骨髓 MSCs 相似的分子免疫表型特征, 也表明 hAMSCs 和 hPDLSCs 均为间质来源的多能干细胞, 具有较低的免疫原性; 但是 hPDLSCs 表达 CD34、CD45、CD11b、CD19 和 HLA-DR 阳性的总百分率高于 hAMSCs 组, 提示 hPDLSCs 的免疫原性可能高于 hAMSCs。以往的研究表明, 在相同剂量 IFN- $\gamma$  刺激下, hPDLSCs 较骨髓干细胞高表达 HLA-DR 和 CD50, 而在对 T 淋巴细胞克隆增殖的调节研究中, hPDLSCs 显示出缺乏抑制 T 淋巴细胞克隆性增殖的能力, 也表明不同来源 MSCs 对免疫炎症反应可能存在的不同的应答能力<sup>[19]</sup>。

大量研究表明, Sox2、Nanog 和 Oct4 参与胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ESCs) 和 MSCs 的自我更新及多能性的调控, 三者的平衡使 ESCs 处于稳定的自我更新状态, 并具有多个胚层分化的能力, 任何一个基因表达的改变都会引起 ESCs 向特定胚层细胞的分化能力改变<sup>[20-21]</sup>。其中, Nanog 十分有利于维持 ESCs 处于稳定的未分化状态<sup>[22]</sup>, 并维持内细胞团细胞的多能性<sup>[23]</sup>; Sox2 在维持干细胞增殖和抑制定向

分化中起到积极作用,并且 Sox2 基因在维持 ESCs 自我更新时需要保持其 mRNA 在较小的变化范围,两倍或更低水平的过表达 Sox2 基因都会诱导 ESCs 细胞分化为神经外胚层、中胚层和滋养外胚层细胞,但不会分化为内胚层细胞<sup>[24]</sup>。ESCs 在向成熟滋养层细胞或中枢神经系统逐渐分化的过程中,Sox2 表达逐渐下调,并且在终末分化的细胞中不表达<sup>[25]</sup>。体外实验证实,Sox2 过表达可使胃癌细胞株 MKN28 发生增殖周期阻滞,并促进细胞凋亡。C-myc 基因属于原癌基因,参与调控细胞的生长、分化、凋亡及自我更新,过表达会导致细胞的恶性增殖,与癌症发生密切相关<sup>[26]</sup>;Oct4 适宜的蛋白表达水平对于维持干细胞的多能性也十分重要,当 Oct4 表达受抑制,细胞周期抑制因子 p21 及分化相关基因 p63 表达上调<sup>[27]</sup>。本实验中,hAMSCs 和 hPDLSCs 的上述 4 个干性基因表达水平比较一致,其中较高水平的 C-myc mRNA 表达可能对保持干细胞的自我更新和增殖具有重要作用;其次是 Nanog 和 Oct4 表达水平相似,对于维持 hAMSCs 和 hPDLSCs 的干性和非分化状态具有重要意义;Sox2 mRNA 的不表达或极低表达,则提示体外培养到第 3 代的 hAMSCs 和 hPDLSCs 向神经细胞外胚层分化的能力相对较低。另有研究证明,Sox2 敲除的小鼠 ESCs 只要维持 Oct4 的表达就可以阻止其分化<sup>[28]</sup>,Sox2 在干细胞中的表达下调优先于 Oct4,当 Sox2 对 Oct4 的限制解除,以骨桥蛋白为代表的原始内胚层谱系的系列基因表达才逐渐升高<sup>[29]</sup>,表明这两种 MSCs 目前保持了良好的中胚层来源特性,或许也提示第 3 代 hAMSCs 和 hPDLSCs 向内胚层细胞分化能力高于外胚层,并且 Oct4 在维持干细胞多能性方面可能更据主导地位。当然在特定诱导条件下,添加维生素 C、正丁基苯酚、SFRP2 等干预因素<sup>[30-32]</sup>,在可保持 Oct4 表达的同时,上调 Sox2 的表达,仍可促进 MSCs 向外胚层细胞分化。

总之,培养至第 3 代的 hAMSCs 与 hPDLSCs 的形态学特征、免疫表型分子和干性基因表达方面具有一定的相似性,但 hAMSCs 的免疫原性可能更低。

## 参考文献

- [1] 高小月,张玉泉,杨晓清.人脐带间充质干细胞在组织损伤修复中的研究进展[J].生物医学工程与临床,2018,22(2):208-213.
- [2] MCGIVERN J V,EBERT A D. Exploiting pluripotent stem cell technology for drug discovery, screening, safety, and toxicology assessments [J]. *Adv Drug Deliv Rev*,2014,69/70:170-178.
- [3] LI H J,SHEN S,FU H T,et al. Immunomodulatory functions of mesenchymal stem cells in tissue engineering [J]. *Stem Cells Int*, 2019 (2019):9671206.
- [4] MOHAMMADI M,JAAFARI M R,MIRZAEI H R,et al. Mesenchymal stem cell; a new horizon in cancer gene therapy[J]. *Cancer Gene Ther*,2016,23(9):285-286.
- [5] LIU R,ZHANG X,FAN Z,et al. Human amniotic mesenchymal stem cells improve the follicular microenvironment to recover ovarian function in premature ovarian failure mice[J]. *Stem Cell Res Ther*,2019,10(1):299.
- [6] YUAN J,HUANG G R,XIAO Z,et al. Overexpression of  $\beta$ -NGF promotes differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into neurons through regulation of AKT and MAPK pathway[J]. *Mol Cell Biochem*,2013,383(1/2):201-211.
- [7] 孙海宁,雷海锋,王振清,等.鼻黏膜外胚层间充质干细胞诱导分化成骨细胞的实验分析[J].中国医药导报,2016,13(23):29-32,37.
- [8] GUGLIANDOLO A,BRAMANTI P,MAZZON E. Mesenchymal stem cell therapy in Parkinson's disease animal models[J]. *Curr Res Transl Med*,2017,65(2):51-60.
- [9] SCUTERI A,MONFRINI M. Mesenchymal stem cells as new therapeutic approach for diabetes and pancreatic disorders[J]. *Int J Mol Sci*,2018,19(9):2783-2796.
- [10] LIM J Y,RYU D B,LEE S E,et al. Mesenchymal stem cells (MSCs) attenuate cutaneous sclerodermatous graft-versus-host disease (Scl-GVHD) through inhibition of immune cell infiltration in a mouse model[J]. *J Invest Dermatol*,2017,137(9):1895-1904.
- [11] ZHAO R C. Stem cells: basics and clinical translation[M]. Springer Science Business Media Dordrecht,2015:29-66.
- [12] 王飞翔,贺慧霞,贾雅丽,等.牙髓,牙周膜及脐带间充质干细胞三系分化能力的体外比较研究[J].口腔颌面修复学杂志,2016,17(3):129-134.
- [13] 张一帆,房兵.牙再生的研究进展[J].中国口腔颌面外科杂志,2017,15(6):564-568.
- [14] 余丽梅.一种完全培养基及人羊膜间充质干细胞的培养方法:CN102191218A[P].2011-03-28.
- [15] XU S F,YU L M,FAN Z H,et al. Improvement of ginsenoside Rg1 on hematopoietic function in cyclophosphamide-induced myelosuppression mice[J]. *Eur J Pharmacol*,2012,

- 695(1/3):7-12.
- [16] DOMINICI M, LE BLANC K, MUELLER I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement [J]. *Cytotherapy*, 2006, 8(4):315-317.
- [17] CONSENTIUS C, MIRENSKA A, JURISCH A, et al. In situ detection of CD73+CD90+CD105+ lineage: Mesenchymal stromal cells in human placenta and bone marrow specimens by chipcytometry[J]. *Cytometry A*, 2018, 93(9):889-893.
- [18] DE CESARIS V, GROLLI S, BRESCIANI C, et al. Isolation, proliferation and characterization of endometrial canine stem cells [J]. *Reprod Domest Anim*, 2017, 52(2):235-242.
- [19] VASANDAN A B, SHANKAR S R, PRASAD P A, et al. Functional differences in mesenchymal stromal cells from human dental pulp and periodontal ligament[J]. *J Cell Mol Med*, 2014, 18(2):344-354.
- [20] SILVA J, SMITH A. Capturing pluripotency[J]. *Cell*, 2008, 132(4):532-536.
- [21] NIWA H. How is pluripotency determined and maintained? [J]. *Development*, 2007, 134(4):635-646.
- [22] CHAMBERS I, SILVA J, COLBY D, et al. Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development[J]. *Nature*, 2007, 450(7173):1230-1234.
- [23] SILVA J, NICHOLS J, THEUNISSEN T W, et al. Nanog is the gateway to the pluripotent ground state[J]. *Cell*, 2009, 138(4):722-737.
- [24] KOPP J L, ORMSBEE B D, DESLER M, et al. Small increases in the level of Sox2 trigger the differentiation of mouse embryonic stem cells [J]. *Stem Cells*, 2008, 26(4):903-911.
- [25] STREBINGER D, DELUZ C, FRIMAN E T, et al. Endogenous fluctuations of OCT4 and SOX2 bias pluripotent cell fate decisions[J]. *Mol Syst Biol*, 2019, 15(9):e9002.
- [26] LEWIS L M, EDWARDS M C, MEYERS Z R, et al. Replication study: transcriptional amplification in tumor cells with elevated c-Myc[J]. *Elife*, 2018, 7:e30274.
- [27] GRECO S J, LIU K, RAMESHWAR P. Functional similarities among genes regulated by Oct4 in human mesenchymal and embryonic stem cells[J]. *Stem Cells*, 2007, 25(12):3143-3154.
- [28] MASUI S, NAKATAKE Y, TOYOOKA Y, et al. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells[J]. *Nat Cell Biol*, 2007, 9(6):625-635.
- [29] BOTQUIN V, HESS H, FUHRMANN G, et al. New POU dimer configuration mediates antagonistic control of an osteopontin preimplantation enhancer by Oct-4 and Sox-2[J]. *Genes Dev*, 1998, 12(13):2073-2090.
- [30] WEI F, QU C, SONG T, et al. Vitamin C treatment promotes mesenchymal stem cell sheet formation and tissue regeneration by elevating telomerase activity[J]. *J Cell Physiol*, 2012, 227(9):3216-3224.
- [31] 陈俊, 杨自金. 鼠神经生长因子体外诱导脐血间充质干细胞向类神经元分化[J]. *中国组织工程研究*, 2018, 22(13):2027-2032.
- [32] LIN X, DONG R, DIAO S, et al. SFRP2 enhanced the adipogenic and neuronal differentiation potentials of stem cells from apical papilla [J]. *Cell Biol Int*, 2017, 41(5):534-543.

(收稿日期:2019-12-18 修回日期:2020-02-02)

(上接第 2248 页)

- [14] POST S J, SHAPIRO J A, WUEST W M. Connecting iron acquisition and biofilm formation in the ESKAPE pathogens as a strategy for combatting antibiotic resistance[J]. *Medchemcomm*, 2019, 10(4):505-512.
- [15] 唐伟, 程锦楠, 余玥, 等. 细菌生物被膜对大肠埃希菌多药耐药的影响[J]. *中华医院感染学杂志*, 2019, 29(3):326-329.
- [16] 胡继宏, 朱翠明. 环二鸟苷酸调控细菌生物膜形成的研究进展[J]. *中南医学科学杂志*, 2017, 45(3):318-320.
- [17] TAN J W H, WILKSCH J J, HOCKING D M, et al. Positive autoregulation of mrkHI by the cyclic di-GMP-dependent MrkH protein in the biofilm regulatory circuit of *Klebsiella pneumoniae* [J]. *J Bacteriol*, 2015, 197(9):1659-1667.

(收稿日期:2019-12-28 修回日期:2020-03-02)