

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.11.001

· 基础研究 ·

NGF 基因重组慢病毒载体的构建及其在人脐带血间充质干细胞的表达 *

吴建红 汪东亚 盛璐 陈凯 孙忠全 钱伟庆[△]

(复旦大学附属华东医院 泌尿外科 上海 200433)

摘要 目的:构建神经生长因子(NGF)的慢病毒表达载体,并观察其转染人脐带间充质干细胞后的表达情况。**方法:**采用实时定量PCR(RT-PCR)方法获取 NGF 基因编码片段,并将构建的慢病毒载体质粒与包装质粒和包膜质粒共转染 293T 细胞,包装生产慢病毒。应用相同滴度的慢病毒转导等量间充质干细胞(MSCs),观察转染后细胞的生长形态及生长曲线,再采用 RT-PCR、Western Blot 方法检测 NGF mRNA、蛋白质的表达水平。**结果:**经 PCR、酶切和测序结果证明成功构建 NGF 基因重组慢病毒载体。同时 NGF 基因重组慢病毒载体能够成功转染人脐带间充质干细胞,转染率达 95.35%,转染后干细胞在 NGF mRNA 及蛋白质的表达方面较对照组明显升高,同时经倒置显微镜观察及生长曲线实验证实转染后干细胞的生长与对照组相比无明显差异。**结论:**重组 NGF 的慢病毒表达载体能够高效的转染人脐带间充质干细胞,基因转染后干细胞的增殖分化能力与未转染细胞差异无统计学意义,可作为一种高效的干细胞转染方法。

关键词:神经生长因子;慢病毒载体;勃起功能障碍

中图分类号:R-33;Q78;R331.2;R587.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)11-2001-06

Construction of Lentiviral Expression Vector of NGF and Its Expression in Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell*

WU Jian-hong, WANG Dong-ya, SHENG Lu, CHEN Kai, SUN Zhong-quan, QIAN Wei-qing[△]

(Department of Urology, Huadong Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai, 200433, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of nerve growth factor gene transfection via a recombinant lentiviral virus vector on the proliferation and cell cycle of human umbilical cord mesenchymal stem cells cultured in vitro. **Methods:** The NGF gene was cloned into lentiviral shuttle plasmid, and identified by the enzyme cut assay, PCR and gene sequencing. It was then transfected into 293T cells to construct the recombinant lentiviral vector plasmid. Cellular proliferation was determined by cell growth curve and Cell Counting Kit-8 assay. The infection efficiency of lentiviral virus transfection was detected by fluorescence microscope and the protein expression of NGF was tested by Western blot. **Results:** NGF gene recombinant lentiviral vector was successfully transfected into human umbilical cord mesenchymal stem cells, and the transfection rate reached 95.35%. The expression of NGF mRNA and protein in stem cells was significantly higher than that in the control group after transfection. It was confirmed by inverted microscope observation and growth curve experiment that the growth of stem cells after transfection was not significantly different from that of the control group. **Conclusion:** These findings suggest that the recombinant lentiviral virus-mediated nerve growth factor gene can transfect the umbilical cord mesenchymal stem cells. There was no significant difference in the proliferation and differentiation ability of stem cells after transfection with untransfected cells.

Key words: Nerve growth factor; Lentiviral vector; Erectile dysfunction

Chinese Library Classification(CLC): R-33; Q78; R331.2; R587.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)11-2001-06

前言

糖尿病性勃起功能障碍 (diabetes mellitus induced erectile dysfunction, DMED)是男性糖尿病患者的并发症之一,其发生

率约为 35%~90%是非糖尿病患者发病率的 3 倍^[1-3]。目前对于 DMED 的治疗效果并不理想,仅对 50%~60%的患者有效^[4]。DMED 发病机制复杂,涉及多个方面,具体包括血管、神经、神经递质、内分泌及代谢等,其中神经病变是其最重要原因,神经

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81400683)

作者简介:吴建红(1986-),博士研究生,主治医师,主要研究方向:干细胞在泌尿系统应用,电话:021-62483180, E-mail: wujianhong1986@163.com

[△] 通讯作者:钱伟庆(1965-),教授,主要研究方向:泌尿系肿瘤, E-mail: qwq222@yahoo.cn, 电话:021-62483180

(收稿日期:2018-12-09 接受日期:2019-01-04)

生长因子(nerve growth factor, NGF)的减少是神经病变的基础。前期实验中我们发现糖尿病大鼠阴茎组织中 NGF 蛋白表达水平较正常组明显降低,因此我们认为 NGF 的表达与糖尿病性 ED 的发生发展密切相关。NGF 是一种重要的神经细胞生长调节因子,它同时具有营养神经和促进神经轴突生长的效应^[5-7]。

近年来基因治疗和干细胞治疗的深入研究为 ED 治疗提供了新的选择。干细胞具有自身复制和多向分化的潜能,在注入体内后有明显趋化性,较明显地集中到达受损伤的部位并在局部微环境的诱导下,发生明显的诱导分化,使干细胞向损伤组织修复所急需的组织细胞分化,从而促进损伤组织的修复。同时干细胞具有很强的自我扩增能力,能够耐受基因导入后长时间的筛选过程,一旦与外源基因整合,单个稳定表达的细胞就能无限扩增成为稳定的转基因细胞系用于研究,而且这样可以减少了基因直接用于人体治疗的未知不良影响^[8-10]。

本实验拟构建 NGF 的慢病毒表达载体,并观察其转染 MSCs 后 NGF 表达的变化情况,为下一步体内、外实验奠定基础,从而为验证我们上述的实验设想奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 试剂名称:

1 kp DNA ladder Marker;250bp DNA ladder Marker;In-Fusion™ PCR Cloning Kit;Taq polymerase;dNTP;Primer;限制性内切酶;Plasmid 抽提 Kit;琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒。

1.1.2 主要仪器及器材 仪器名称:PCR 仪;positive clone 测序;稳压 DNA 电泳仪;凝胶成像仪;Gilson 移液器;细菌摇床;细菌培养箱;高速离心机。

1.1.3 细胞 293T 细胞(实验室现有),大肠杆菌菌株 DH5 α 。

1.2 方法

1.2.1 NGF 慢病毒质粒的制备和检验 实验中我们按照 Ubi-MCS-3FLAG-SV40-EGFP 的载体元件顺利进行试验,选择 AgeI 克隆位点。

用上游引物 5'-GAGGATCCCGGGTACCGGTCGCCAC-CATGTCCATGTTGTTCTACAC-3' 和下游引物 5'-TCCTTG-TAGTCCATACCGGCTCTTCTCACAGCCTTC-3',经 PCR 在 293T 细胞中扩增 NGF 基因。用氯化钙制备新鲜的大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。重组的 PCR 产物经纯化和定向连接后转化感受态细胞。采用 PCR 鉴定阳性克隆。

1.2.2 质粒表达检测 选取对数生长期的 293T 细胞悬液,37℃、5%培养箱培养至细胞融合 80%,按照 Lipofectamine 2000 的使用说明操作,将 NGF 质粒转染 293T 细胞。一天后,利用荧光显微镜观察荧光标记基因的表达情况,判断感染效率,转染 36 小时后,收集细胞,Western Blot 检测 NGF 的蛋白表达。

1.2.3 NGF 慢病毒包装及滴度检测 制备编码慢病毒颗粒的重组及两种辅助包装原件载体质粒,三种质粒载体分别进行高纯度无内毒素提取,按 Lipofectamine 2000 使用说明进行共转染 293T 细胞,转染 8 h 后更换完全培养基,培养 48 h 后,收集上清液,浓缩后移出,分装保存于病毒管中,于 -80℃ 冻存。取一支用 RT-PCR 法测定病毒滴度。

1.2.4 NGF 慢病毒载体构建 将重组的慢病毒载体行 1.0%琼

脂糖凝胶电泳。将慢病毒载体线性化,并将目的片段和载体进行连接,再进行重组 EGFP-NGF 质粒的转化。挑选 4 个克隆,进行质粒小量抽提。

1.2.5 重组 NGF 慢病毒载体质粒的鉴定 对重组慢病毒载体 pLVTHM-EGFP-NGF 质粒的双酶切:取适量酶切产物反应液,行 1%琼脂糖凝胶电泳检测,在凝胶图像分析仪上观察 DNA 电泳条带。上述电泳鉴定正确的质粒,由生工生物工程(上海)有限公司进行测序鉴定。

1.3 建立过表达 NGF 的人脐带血间充质干细胞

1.3.1 慢病毒的包装、浓缩和滴度测定 通过三种质粒共转染 293T 细胞产生复制缺陷型慢病毒。利用脂质体 Lipofectamine 2000 将载体质粒、包装质粒和包膜质粒以 2:1:1 的质量比例共转染 293T 细胞。根据病毒转导 293T 细胞后 EGFP 蛋白的表达水平来测定功能滴度。选择阳性率为 10%-30%的孔进行计算,取滴度的平均值。

1.3.2 重组慢病毒转导靶细胞 MSCs 分别将两种特异质粒和空载体质粒对应的慢病毒上清转导 MSCs,将 MSCs 以 5×10^5 个细胞/孔的密度接种于 6 孔板,达到 70%融合时进行转导,每种病毒各备 2 孔,另设空白对照;用 2 个感染复数(MOI)的病毒液按前述方法转导 MSCs。转导后第 3 天收获 MSCs。

1.3.3 倒置相差显微镜观察转染细胞的生长形态 每天在倒置相差显微镜下观察细胞生长情况,包括细胞的数量、大小、形态、活力、有无污染等,并照相记录。

1.3.4 转染细胞生长曲线绘制 收集处于对数生长期转染 NGF 基因后第 2 代人脐带间充质干细胞及第 5 代人脐带间充质干细胞,计数。再以含 10%FBS 的 DMEM/F12 培养液调整细胞密度为 1.5×10^4 个/mL,接种于 24 孔板中(100 μ L/孔),实验组和空白对照组各设置 5 个复孔,置于 5% CO₂、37℃ 培养箱中,培养 24 h。24 h 后,更换新鲜培养液,同时设置加培养液不加细胞的空白对照;每个浓度的每个时间点接种 5 个复孔。置于 5% CO₂、37℃ 培养箱中分别培养 24、48、72、96、120、144、168、192、216、240 h。在预定培养时间结束前 4 h,每孔加入 10 μ L 的 CCK8 10 μ L;继续置于 5% CO₂、37℃ 培养箱中培养 2 h。酶联免疫检测仪上检测各孔在 450 nm 波长时的吸光度值(optical density, OD)。以时间为横坐标,以为 450 nm 波长时的吸光度值为纵坐标,绘制各个时间点的细胞生长曲线。

1.3.5 RT-PCR 检测 NGF mRNA 水平 RT-PCR 行一个循环的溶解曲线,观察反映扩增的特异程度。NGF mRNA 的表达水平用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ (即与管家基因 Ct 值差值的差值)方法检测。

1.3.6 Western Blot 检测 NGF 蛋白表达 按 4:1 比例将各蛋白样品及缓冲液混合。转膜后将膜放入含兔抗 NGF 多克隆抗体(1:300)的 5%脱脂奶粉的 1 $\times$ TBS-T 液中,4℃ 反应过夜。用 TBS-T 洗涤三次,每次 5 min。采用小鼠抗 β -actin 单克隆抗体(1:500)作为对照。用含 5%脱脂奶粉的 1 $\times$ TBS-T 液稀释二抗,即 HRP 标记的山羊抗兔 IgG(1:1000),室温下摇动反应 2 h。采用 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG(1:5000)作为对照。胶片拍照后用图像处理系统分析目标条带的分子量和净光密度值。

1.4 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计软件分析,实验数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用 t 检验或方差分析。P<0.05 为差异有显著性

意义, $P < 0.01$ 为差异有极显著性意义。

2 结果

2.1 NGF 基因重组慢病毒载体的构建

2.1.1 成功获取 NGF 基因片段 RT-PCR 后行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测于 767 bp 处见目的条带(图 1)。

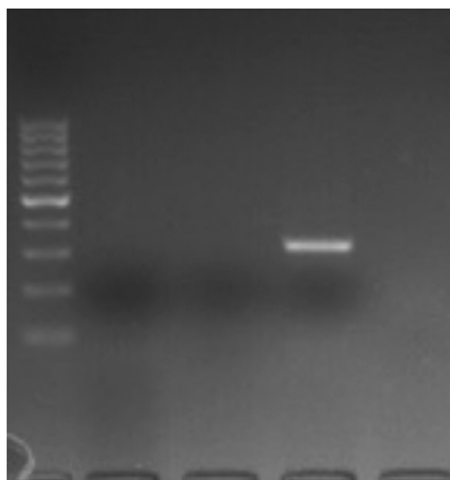


图 1 人 NGF 基因 RT-PCR 后电泳结果

Fig.1 The electrophoresis results of human NGF gene after RT-PCR

2.1.2 EGFP-NGF 重组质粒双酶切鉴定 GFP-NGF 重组质粒双酶切后, 可见 767 bp 处的目的条带以及 11.0 kbp 处的载体条带(图 2)。

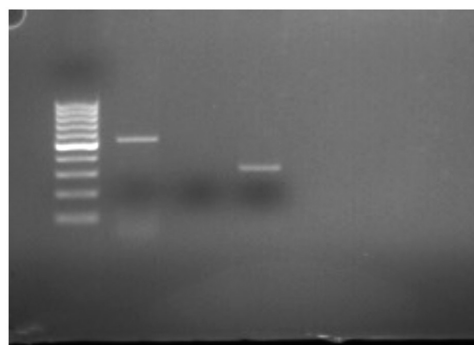
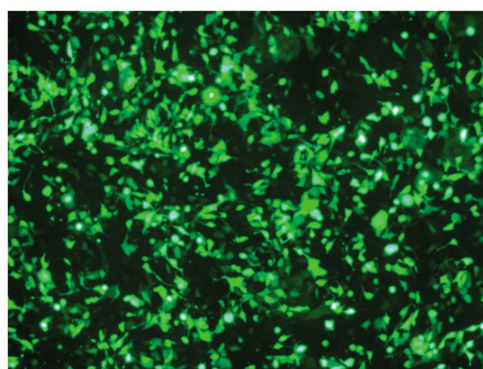


图 2 EGFP-NGF 重组质粒酶切鉴定

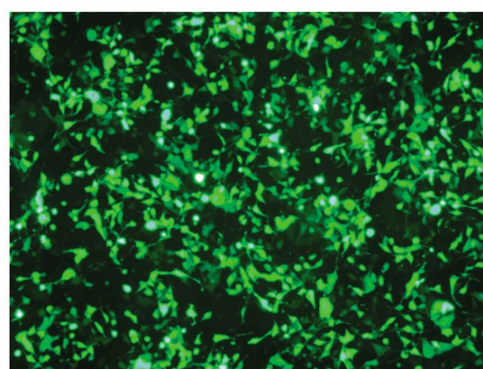
Fig.2 The identification of EGFP-NGF recombinant plasmid by restriction enzyme digestion

2.2 慢病毒的包装、浓缩及功能滴度测定

通过慢病毒载体质粒, 包膜质粒和包装质粒共转染 293T 细胞, 包装生产慢病毒。经转染 48 h, 在倒置荧光显微镜下可观察到大量表达 EGFP 的 293T 细胞, 表达阳性率达 95% 以上(图 3)。各组未浓缩慢病毒悬液经超速离心后功能滴度可提高 100 倍。



A



B

图 3 慢病毒转导 293T 细胞后表达 EGFP ($\times 40$)

Fig.3 The expression of EGFP in 293T cells by Lentiviral transduction

A: NGF- 293T cell; B: null- 293T cell.

2.3 过表达 NGF 的人脐带血间充质干细胞建立

2.3.1 慢病毒转导的 MSCs MSCs 经慢病毒转导 48 h 后, 倒置荧光显微镜下可观察到大量表达 EGFP 的 MSCs 细胞, 通过流式细胞术测定 NGF-MSCs 组和空白组 EGFP 阳性率分别为 95.35%、96.28%(图 4)。

2.3.2 倒置相差显微镜观察转染 NGF 基因前后细胞形态 转染目的基因 NGF 基因后人脐带间充质干细胞形态与正常对照组细胞相比并未发生明显改变, 呈形态较为均一的梭形成纤维细胞, 漩涡样生长。细胞密度较大时, 被压缩成较方的多角形。细胞传至十余代, 在形态上, 无明显变化(图 5)。

2.3.3 生长曲线绘制 转染目的基因 NGF 基因后人脐带间充质干细胞和第 10 代人脐带间充质干细胞生长曲线(如图 6)。

2.3.4 RT-PCR 检测 NGF mRNA 表达 经慢病毒作为载体介

导 NGF 基因转染 48 h 后, NGF 转染组脐带间充质干细胞检测到 NGF mRNA 表达, 对照组、空载病毒组未检测到 NGF mRNA 表达, 表明 NGF 基因已稳定整合入转染脐带间充质干细胞的基因组中。

2.3.5 Western Blot 检测 NGF 通过 Western blot 产物电泳, 经慢病毒作为载体介导 NGF 基因转染 48 h 后, NGF 转染组脐带间充质干细胞检测到 NGF 蛋白表达, 对照组、空载病毒组均未检测到神经生长因子蛋白表达, 表明 NGF 基因已稳定整合入转染脐带间充质干细胞的基因组中, 并且能够稳定的表达目的蛋白, 经灰度值分析, 对照组的灰度值分别为 0.005 ± 0.0001 , 0.008 ± 0.0004 , 实验组的灰度值为 0.785 ± 0.092 , 显著高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)(图 7)。这与 RT-PCR 检测结果一致, 表明 MSCs 能够有效表达 NGF 基因。

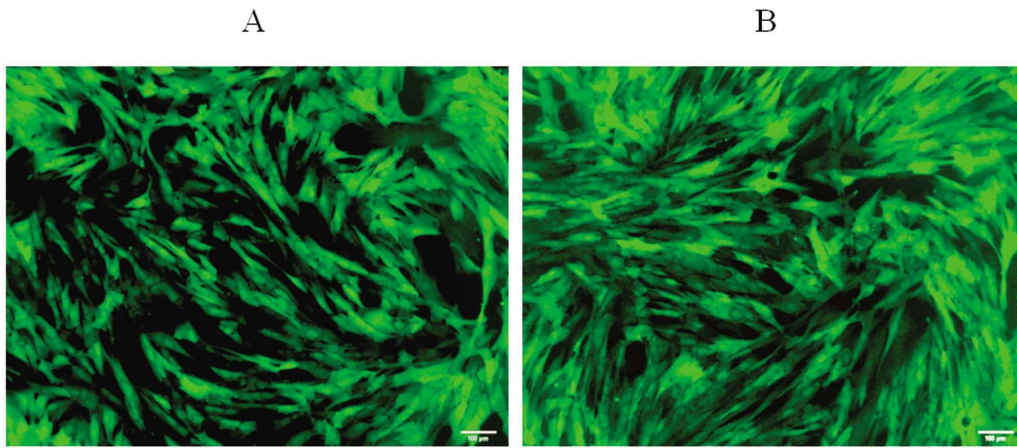


图4 慢病毒转导 MSCs 后表达 EGFP ($\times 40$)

Fig.4 The expression of EGFP in MSCs by Lentiviral transduction

A: NGF-MSCs group; B: null-MSCs group.

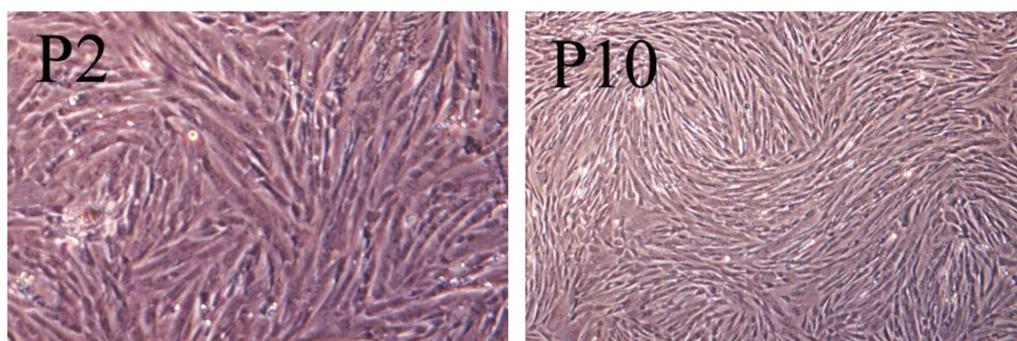


图5 NGF 转染后干细胞生长情况

Fig.5 The growing situation of MSCs after NGF transfection

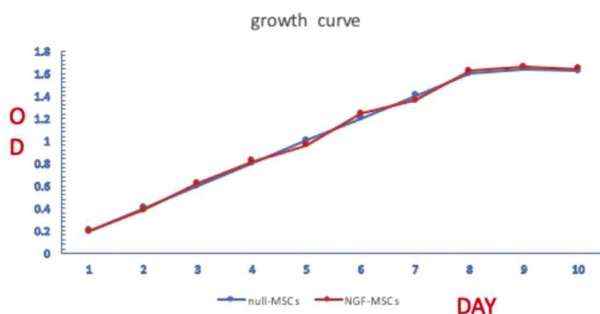


图6 NGF 转染后干细胞生长曲线

Fig.6 The Growth Curves of MSCs transfected with NGF

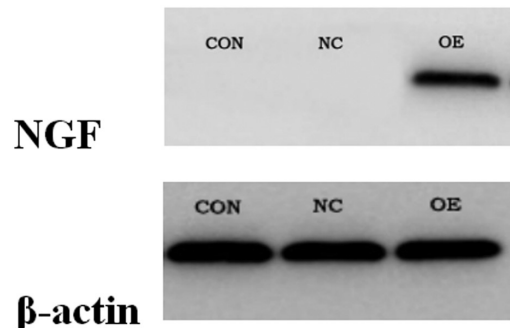


图7 慢病毒转染后 MSCs 中 NGF 蛋白的表达

Fig.7 The expression of NGF protein in MSCs after lentiviral transfection

3 讨论

DMED 发病机制复杂, 涉及多个方面, 具体包括血管、神经、神经递质、内分泌及代谢等, 其中神经病变是其最重要原因, 神经生长因子(nerve growth factor, NGF)的减少是神经病变的基础。

神经生长因子是典型的靶源性神经营养因子, 具有营养神经元和促进突触生长的双重功能。神经生长因子的减少是神经病变的基础。神经生长因子不仅对神经系统具有重要的神经元营养和促神经突起生长的生物效应, 在非神经系统中也具有调节免疫, 促进损伤修复的作用, 我们在前期试验中也发现糖尿病大鼠阴茎组织中 NGF 蛋白表达水平较正常组明显降低, 因

此我们认为 NGF 的表达与糖尿病性 ED 的发生发展密切相关。NGF 是神经营养因子家族中的重要成员之一, 是一种重要的神经细胞生长调节因子, 兼有神经元营养和促进轴突生长的双重效应, 对神经元的生长、发育、分化及再生和功能性表达均具有重要的调控作用^[1], 然而, 外源性 NGF 存在半衰期短、生物利用度低等问题, 能否通过对某种治疗手段使机体达到持续稳定释放 NGF, 成为治疗的关键所在。

近年来基因治疗和干细胞治疗的深入研究为男性勃起功能障碍的治疗提供了新的选择。离子通道和细胞间通讯的研究为 ED 基因治疗带来了极大的优势及可行性, 然而目前基因转染常用的腺病毒载体却因治疗引起的炎症反应、目的基因的无选择性表达、以及存在潜在的致癌风险等因素^[12,13], 使得其难以

得到推广及大规模应用。

干细胞是一类具有自身复制和多向分化潜能的细胞,干细胞有明显趋化性,在注入体内后能够迅速到达受损部位,同时在受损部位局部微环境的刺激诱导下,干细胞可发生诱导分化为损伤组织修复所急需的组织细胞,以促进受损组织的修复。干细胞强大的自我扩增能力,使得其能够耐受基因转染后长时间的筛选过程,与外源基因整合后,干细胞能够无限扩增成为稳定的转基因细胞用于后续研究^[14]。

根据分化潜能,干细胞主要分为3种类型:(1)全能干细胞(totipotent stem cells),此类干细胞具有生成胚胎和支持胚胎在子宫中生长发育的全部细胞和组织、并继续分化生长为成熟个体的潜能。只有胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)属于全能干细胞。(2)多能干细胞(multipotent stem cells),也具有分化为多种成熟细胞组织的潜能,但发育潜能受到一定的限制,失去了发育成完整个体的能力,如神经干细胞,具有一定限度的多潜能分化能力,可分化为神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞。研究表明,多能的成体干细胞在正常组织中仅单向分化;当组织受损时,其多潜能性被激活,从而产生多种类型细胞以修复、替代损伤组织,例如骨髓间充质干细胞。(3)单能干细胞(unipotent stem cells),也称专能、偏能干细胞,这类干细胞只能向一种类型或密切相关的两种类型的细胞分化,如眼角膜缘干细胞只能分化为角膜上皮细胞^[15,16]。

间充质干细胞是多能干细胞的一种,国内外多个实验组报道了骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)体外特定条件下能转化为神经元样细胞,使骨髓 MSCs 受到越来越多的关注^[16,17], MSC 的营养支持在治疗中起主要作用。源于神经血管破坏的实验性糖尿病周围神经病变,在应用血管内皮生长因子(VEGF)治疗后病变可发生逆转^[18], MSC 在损伤局部除分化为血管内皮细胞促进新生血管的形成外,还反应性分泌各种生长因子,如 VEGF、脑源性神经营养因子(BDNF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、神经生长因子(NGF)和肝细胞生长因子(HGF)等,这些因子能产生神经保护作用 and 促进局部微血管再生,促进组织回到“进化”状态,支持新生血管形成、神经再生和重构,从而起到治疗神经损伤的作用^[14,15]。

目前用于 ED 治疗研究的干细胞种类繁多,常见的主要包括脂肪间充质干细胞、骨髓间充质干细胞、肌源性干细胞、脐血干细胞、胚胎干细胞、脑源性干细胞以及尿源性干细胞等。其中脐带来源的间充质干细胞(human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells, HUMSCs)具有增殖能力强、分化潜力大、免疫原性低、无道德伦理问题的限制、取材方便、易于工业化制备等特征,使得其在种类众多的干细胞中脱颖而出,有望成为组织工程及基因治疗的种子细胞,广泛地应用于科研和临床研究^[19-25]。

脐带中分离出 MSC 的重要意义在于,脐带作为分娩废弃物,来源广泛,取材方便,对供者无任何损伤不受任何伦理及法理限制且 MSC 含量丰富,免疫原性低,不表达 HLA-DR,因此有望成为脐血和骨髓 MSC 的替代来源,广泛地用于科研和临床前试验。

有研究显示人脐带间充质干细胞能够顺利分离和体外扩增,通过连续传代可获得稳定的干细胞^[26,27],我们在前期实验中

也顺利利用组织块贴壁发成功分离培养人脐带间充质干细胞。然而,作为基因治疗的关键步骤,如何安全搞笑的将目的基因导入,并持续稳定的表达目的基因仍然是一个困扰大家的问题^[28],慢病毒载体是目前基因工程研究的热点之一,它具有安全性好、免疫原性低、致病性低、潜伏感染、定向导入、能介导基因长期稳定表达、简单易行等优点^[29],所以作为一种基因治疗的导入载体,慢病毒载体在基因治疗的研究中受到越来越多的关注^[30]。

基于此,在 ED 的基因治疗及干细胞治疗中,通过对体外培养的干细胞进行目的基因的修饰和改造,让干细胞作为基因治疗的载体进行移植,目前这方面已有相关研究,并取得了良好效果^[8-10]。

本实验在体外通过基因转染技术使人脐带 MSCs 持续稳定的表达 NGF,使通过基因修饰后的人脐带间充质干细胞能够同时发挥基因治疗和细胞治疗作用,这将成为治疗勃起功能障碍的又一良好途径。本项目将为人转基因脐带 MSCs 治疗 DMED 提供实验和理论基础,具有良好的临床应用前景;初步阐明 NGF 和 MSCs 的作用机制,对于揭示 DMED 发生发展及转归机制具有一定的理论意义。

参考文献(References)

- [1] Shamloul R, Ghanem H. Erectile dysfunction [J]. Lancet, 2012, 381: 153-165
- [2] Malavige LS, Jayaratne SD, Kathiriarachchi ST, et al. Erectile dysfunction among men with diabetes is strongly associated with premature ejaculation and reduced libido[J]. J Sex Med, 2008, 5(9): 2125-2134
- [3] Zitzmann M, Mattern A, Hanisch J, et al. IPASS: A Study on the Tolerability and Effectiveness of Injectable Testosterone Undecanoate for the Treatment of Male Hypogonadism in a Worldwide Sample of 1,438 Men[J]. J Sex Med, 2012, 10: 579-588
- [4] Saad MA, Eid NI, Abd El-Latif HA, et al. Potential effects of yohimbine and sildenafil on erectile dysfunction in rats[J]. Eur J Pharmacol, 2013, 700: 127-133
- [5] Zhu H, Yu WJ, Le Y, et al. High glucose levels increase the expression of neurotrophic factors associated with p-p42/p44 MAPK in Schwann cells in vitro[J]. Mol Med Report, 2012, 6: 179-184
- [6] Zheng B, Li T, Chen H, et al. Correlation between ficolin-3 and vascular endothelial growth factor-to-pigment epithelium-derived factor ratio in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy[J]. Am J Ophthalmol, 2011, 152: 1039-1043
- [7] 李锐, 袁慧敏. 鼠神经生长因子联合甲基强的松龙治疗 AON 的疗效[J]. 国际眼科杂志, 2011, 11(12): 2230-2231
- [8] Kim SJ, Park SH, Sung YC, et al. Effect of mesenchymal stem cells associated to matrix on the erectile function in the rat model with bilateral cavernous nerve crushing injury [J]. Int Braz J Urol, 2013, 38: 833-841
- [9] Kovanecz I, Rivera S, Nolasco G, et al. Separate or combined treatments with daily sildenafil, molsidomine, or muscle-derived stem cells prevent erectile dysfunction in a rat model of cavernosal nerve damage[J]. J Sex Med, 2012, 9: 2814-2826
- [10] Hakim L, Van der Aa F, Bivalacqua TJ, et al. Emerging tools for erectile dysfunction: a role for regenerative medicine [J]. Nat Rev Urol, 2012, 9: 520-536
- [11] Principe G, Minnone G, Strippoli R, et al. Nerve growth factor down-

- regulates inflammatory response in human monocytes through TrkA [J]. *J Immunol*, 2014, 192: 3345-3354
- [12] Nossaman BD, Gur S, Kadowitz PJ. Gene and stem cell therapy in the treatment of erectile dysfunction and pulmonary hypertension; potential treatments for the common problem of endothelial dysfunction [J]. *Curr Gene Ther*, 2007, 7: 131-153
- [13] Gur S, Kadowitz PJ, Hellstrom WJ. A review of current progress in gene and stem cell therapy for erectile dysfunction [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2008, 8: 1521-1538
- [14] Singh A, Singh A, Sen D. Mesenchymal stem cells in cardiac regeneration: a detailed progress report of the last 6 years (2010-2015)[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2016, 7: 82
- [15] Pandey AC, Lancaster JJ, Harris DT, et al. Cellular Therapeutics for Heart Failure: Focus on Mesenchymal Stem Cells [J]. *Stem Cells Int*, 2017, 2017: 9640108
- [16] Bongso A, Fong CY. The therapeutic potential, challenges and future clinical directions of stem cells from the Wharton's jelly of the human umbilical cord[J]. *Stem Cell Rev*, 2013, 9: 226-240
- [17] 毛开云, 范月蕾, 王跃, 等. 间充质干细胞治疗产品开发现状与趋势[J]. *中国生物工程杂志*, 2017, 37(10): 126-135
- [18] Ramanathan R, Rupert S, Selvaraj S, et al. Role of Human Wharton's Jelly Derived Mesenchymal Stem Cells (WJ-MSCs) for Rescue of d-Galactosamine Induced Acute Liver Injury in Mice [J]. *J Clin Exp Hepatol*, 2017, 7: 205-214
- [19] Troyer DL, Weiss ML. Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population[J]. *Stem Cells*, 2008, 26: 591-599
- [20] Cooke JP, Losordo DW. Modulating the vascular response to limb ischemia: angiogenic and cell therapies [J]. *Circ Res*, 2015, 116: 1561-1578
- [21] Ding DC, Chang YH, Shyu WC, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: a new era for stem cell therapy [J]. *Cell Transplant*, 2015, 24: 339-347
- [22] Fong CY, Subramanian A, Biswas A, et al. Freezing of Fresh Wharton's Jelly From Human Umbilical Cords Yields High Post-Thaw Mesenchymal Stem Cell Numbers for Cell-Based Therapies[J]. *J Cell Biochem*, 2016, 117: 815-827
- [23] Muheremu A, Sun JG, Wang XY, et al. Combined use of Y-tube conduits with human umbilical cord stem cells for repairing nerve bifurcation defects[J]. *Neural Regen Res*, 2016, 11: 664-669
- [24] Shivakumar SB, Bharti D, Subbarao RB, et al. DMSO- and Serum-Free Cryopreservation of Wharton's Jelly Tissue Isolated From Human Umbilical Cord[J]. *J Cell Biochem*, 2016, 117: 2397-2412
- [25] Wakao S, Matsuse D, Dezawa M. Mesenchymal stem cells as a source of Schwann cells: their anticipated use in peripheral nerve regeneration[J]. *Cells Tissues Organs*, 2014, 200: 31-41
- [26] Gupta R, Tongers J, Losordo DW. Human studies of angiogenic gene therapy[J]. *Circ Res*, 2009, 105(8): 724-736
- [27] Sun K, Guo C, Deng HJ, et al. Construction of lentivirus-based inhibitor of hsa-microRNA-338-3p with specific secondary structure[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2013, 34(1): 167-175
- [28] Mitchell K E, Weiss M L, Mitchell B M, et al. Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia[J]. *Stem Cells*, 2003, 21: 50-60
- [29] 万世奇, 张太平, 王天笑. 重组腺相关病毒载体表达抗表皮生长因子受体抗体对胰腺癌细胞株抑制作用的研究[J]. *中华消化外科杂志*, 2011, 10(4): 286-289
- [30] 李运军, 马林, 隋建丽, 等. 表皮生长因子受体反义重组腺病毒联合放射线对乳腺癌细胞的作用[J]. *中华放射肿瘤学杂志*, 2005, 14(2): 108-111

(上接第 2031 页)

- [26] Amare PS, Baisane C, Saikia T, et al. Fluorescence in situ hybridization: a highly efficient technique of molecular diagnosis and prediction for disease course in patients with myeloid Leukemia[J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 2001, 131: 125-134
- [27] Sharifi M, Salehi R, Gheisari Y, et al. Inhibition of micro RNA miR-99a induces apoptosis and necrosis in human acute promyelocytic leukemia [J]. *Adv Biomed Res*, 2014, 3: 61
- [28] ShaRifi M, Salehi R, Gheisari Y, et al. Inhibition of micro RNA miR-99a induces apoptosis and inhibits cell proliferation in human acute promyelocytic leukemia through modulation of p63 expression [J]. *Mol Biol Rep*, 2014, 41(5): 2799-2808
- [29] Testi AM, Pession A, Diverio D, et al. Risk-adapted treatment of acute promyelocytic leukemia: results from the international Consortium for Childhood APL[J]. *Blood*, 2018, 132: 405-412
- [30] Strocchio L, Gurnari C, Santoro N, et al. Arsenious trioxide and trans retinoic acid treatment for childhood acute promyelocytic leukemia [J]. *Br J Haematol*, 2018, 126: 1200-1206
- [31] Zhu HH, Wu DP, Du X, et al. Oral arsenious plus retinoic acid versus intravenous arsenious plus retinoic acid for non-high-risk: a non-inferiority, randomised phase 3 trial [J]. *Lancet Oncol*, 2018, 19: 871-879