

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.201904016

· 论著 ·

成人鼻腔呼吸黏膜内间充质干细胞的分化特征及其多向诱导分化潜能研究

郭照萌¹, 侯铁奇²

(1. 深圳市龙岗区耳鼻咽喉医院, 广东 深圳 518000; 2. 暨南大学附属第一医院耳鼻咽喉科, 广东 广州 510630)

摘要: **目的** 研究成人鼻腔呼吸黏膜内间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)的分化特征及其多向诱导分化潜能。**方法** 取材及细胞外培养成人鼻腔呼吸黏膜,鼻黏膜组织切片及MSCs免疫荧光染色(体外培养),鼻黏膜MSCs向成骨细胞诱导分化及向神经细胞诱导分化。**结果** Vimentin抗体及Nestin抗体免疫荧光染色成人下鼻甲黏膜冷冻切片显示,双标记的阳性细胞为卵圆形或圆形,在鼻黏膜固有层中广泛分布。免疫荧光染色结果显示干细胞标志蛋白Sall4、CD133、Nestin、Vimentin受传代培养的MSCs表达。钙结节的茜素红染色结果:向成骨细胞诱导培养鼻黏膜MSCs 2周后,茜素红染色显示有大量红色钙结节存在于细胞表面,没有显著钙结节存在于未经诱导的MSCs表面,只有少量茜素红着色;碱性磷酸酶染色结果:碱性磷酸酶染色在向成骨细胞诱导培养鼻黏膜MSCs 2周后呈紫蓝色,未经诱导的MSCs具有极浅的染色。用神经诱导培养液进行2周的诱导后,细胞向神经细胞样显著分化,可见大部分细胞呈BM88与NF-200免疫染色阳性,细胞将多根细长突起发出并相互连接,对照组细胞具有极弱的荧光染色,为长梭形。**结论** 成人鼻腔呼吸黏膜内MSCs广泛存在,具有多向诱导分化潜能,在对骨与软组织损伤进行自体移植修复的过程中可以作为种子细胞得到有效应用,期待临床进一步验证。

关键词: 鼻腔呼吸黏膜;成人;内间充质干细胞;分化特征;多向诱导分化潜能

中图分类号:R322.3*1

Differentiation characteristics and multiple differentiation potential of adult mesenchymal stem cells (MSCs) in nasal and respiratory mucosa

GUO Zhao-meng¹, HOU Tie-qi²

(1. Otolaryngology Hospital, Longgang District, Shenzhen 518000, China; 2. Department of Otolaryngology, the First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 510630, China)

Abstract: **Objective** To study the differentiation characteristics and multiple differentiation potential of mesenchymal stem cells (MSCs) in adult nasal respiratory mucosa. **Methods** A biopsy of adult nasal cavity respiratory mucosa was collected and cultured; MSCs (in vitro culture) immunofluorescence staining were performed. The MSCs of nasal mucosa was induced to differentiate into osteoblasts, and MSCs from nasal mucosa was induced to differentiate into neurons. **Results** the results of immunofluorescence staining with Vimentin antibody and Nestin antibody showed that the double-labeled positive cells were ovoid or round and distributed widely in the lamina propria of the nasal mucosa. The results of immunofluorescence staining showed that the subcultured MSCs expressed Sall4, CD133, Nestin and Vimentin of the stem cell markers. The results of alizarin red (calcium nodules) staining: MSCs of nasal mucosa were osteoinductive at 2 weeks, alizarin red staining showed a large number of red calcium nodules on the cell surface, but no significant calcium nodules existed on the surface of MSCs without induction, only a small amount of alizarin red staining of alkaline phosphatase staining; MSCs 2 after the induction of the cultured nasal mucosa into osteoblasts were stained purplish blue by alkaline phosphatase staining at 2 weeks, and the uninduced MSCs were extremely light blue staining. After induction of MSCs with nerve induction medium, the cells were differentiated significantly into neuronal cells at 2 weeks. The cells were

基金项目:广东省卫生和计划生育委员会(20160608104614652)。

作者简介:郭照萌,男,硕士,主治医师。

通信作者:侯铁奇,Email:kkmarz@126.com

more elongated projections issued and connected with each other, the most cells showed BM88 and NF-200 positive staining. The cells in the control group were very weak fluorescence staining with long shuttle. **Conclusions** Mesenchymal stem cells (MSCs) of adult nasal respiratory mucosa are widely exist in the nasal cavity and respiratory mucosa with multilineage differentiation potentials. The MSCs can be effectively applied as seed cells in the repair of bone and soft tissue injuries by autologous transplantation. It is worthy of clinical's full attention.

Key words: Nasal respiratory mucosa; Adult; Mesenchymal stem cells; Differentiation; Multilineage differentiation potential

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs) 归属于成体干细胞家族。MSCs 具备干细胞的多向分化及自我扩增特性,一方面能够向骨与软骨等中胚层来源的组织分化,另一方面还能够对跨胚层向神经胶质细胞及神经细胞分化进行诱导。在 MSCs 中,外胚层间充质干细胞(ectodermal mesenchymal stem cells, EMSCs)这一类型较为特殊,主要在头面部黏膜的固有层存在。相关医学研究表明^[1], EMSCs 具有向成骨细胞与神经细胞分化的潜能。鼻腔黏膜分为两类,即呼吸黏膜、嗅黏膜。很多相关医学研究均对嗅黏膜干细胞进行了报道,但是却很少有相关医学研究对呼吸黏膜干细胞进行报道。临床普遍认为^[2-4],类似于头面部其他黏膜,呼吸黏膜的 EMSCs 在固有层中也有多向分化潜能存在。为了对组织损伤修复中成人鼻黏膜 EMSCs 自体移植的临床应用价值进行评价,本研究对成人鼻腔呼吸黏膜内 MSCs 的分化特征及其多向诱导分化潜能进行了研究,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

购买 Gibco 公司生产的 Neurobasal 培养液、胎牛血清(FBS)及 B27、DMEM 及 F12 培养液, Santa Cruz 公司生产的山羊抗 CD133 抗体, Abcam 公司生产的兔抗 Nestin、Sall4 及 BM88 抗体、小鼠抗 Vimentin 及 NF-200 单克隆抗体, Sigma 公司生产的组蛋白去乙酰化酶抑制剂 TSA、全反式维甲酸(ATRA)、FITC 或 Cy3 偶联的二抗(抗兔、抗小鼠、抗羊 IgG), 博士德公司生产的 BCIP/MBT 碱性磷酸酶染色试剂, MERCK 公司生产的 β -甘油磷酸钠, 上海化学试剂公司生产的茜素红, 瑞阳制药厂生产的地塞米松, 南京金陵制药厂生产的维生素 C。受试者均知情同意并签署知情同意书, 本研究通过我院伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 成人鼻腔呼吸黏膜的取材及细胞外培养

在无菌条件下进行, 将其少量鼻甲黏膜取出来, 用

4% 甲醛溶液固定其中一部分, 在冻存管液氮中放置冻存另一部分。从鼻腔下鼻甲将少量鼻黏膜夹出, 用含 200 U/ml 链霉素与 200 U/ml 青霉素的无血清 DMEM/F12 混合培养液进行 3 次漂洗将血迹去除, 在含 10% 胎牛血清的 100 U/ml 链霉素与 100 U/ml 青霉素组成的普通完全培养液(DMEM/F-12 培养液)中放置, 充分剪碎, 将 0.25% 胰酶加入其中消化前离心将上清弃去, 同时用吸管将其吹打成鼻黏膜细胞悬液, 然后用完全培养液将消化终止, 离心将胰酶去除。用完全培养液调节细胞浓度到 1×10^6 个/ml, 在 Corning 培养瓶中接种, 在饱和湿度、37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。定期换液, 1 次/3 d, 消化、传代的指征为细胞铺满瓶底。在 3 块 24 孔细胞培养板中接种第 5 代细胞, 其铺有圆盖片, 分别作为神经细胞诱导分化组、成骨细胞诱导分化组、对照组 3 组。

1.2.2 鼻黏膜组织切片及 MSCs 免疫荧光染色(体外培养)

用 4% 多聚甲醛固定上述下鼻甲黏膜 1 d 后在 4℃ 的温度下用 30% 蔗糖磷酸缓冲液对其进行 12 h 的浸泡, 取出指征为黏膜下沉后, 用 Leica 公司生产的恒冷箱切片机切片, 片厚 20 μ m, 贴片, 晾干, 进行 1 d 的后固定。用 Vimentin 抗体及 Nestin 抗体进行免疫荧光染色, 然后对鼻黏膜中 MSCs 的分布特征进行观察, 具体为: 在 37℃ 的温度下用 0.25% TritonX-100 对切片进行 1 h 的孵育, PBS 漂洗后用相应二抗进行 1 h 的孵育, 之后进行 PBS 漂洗, 用 Hoechst33342 对细胞核进行复染, PBS 漂洗, 封片, 观察在 Leica 荧光显微镜下进行。阴性对照用 PBS 将第一抗体取代掉。神经细胞诱导分化组、对照组的 MSCs 在 24 孔培养板中接种, 在进行 1 周的培养后用 4% 多聚甲醛进行 1 d 的固定, 分别干细胞标志蛋白 Sall4、CD13、Mestin、Vimentin 的抗体进行免疫荧光染色, 鉴定 MSCs 的干细胞特性。

1.2.3 鼻黏膜 MSCs 向成骨细胞诱导分化

更换 DMEM/F-12 完全培养液为成骨诱导培养液的指征为上述 24 孔培养板中 MSCs 贴壁, DMEM/F-12 的组成成分为 10% 胎牛血清 + β -甘油磷酸钠

10 mmol/L + 地塞米松 100 mmol/L + 维生素 C 0.05 mmol/L, 继续培养, 将不诱导对照孔设立起来, 定期半量换液, 1 次/3 d。进行 2 周的诱导培养后吸出培养板中的培养液, 进行 2 次漂洗, 在此过程中将充分利用 PBS 起来, 对部分细胞进行染色, 将成骨细胞显示出来, 对部分细胞进行染色, 将钙结节显示出来。用 4% 多聚甲醛固定染色后的细胞, 封片后观察并摄片, 用甘油封片, 显微镜下观察。

1.2.4 鼻黏膜 MSCs 向神经细胞诱导分化 更换 Neurobasal 培养液为神经诱导培养液的指征为上述 24 孔培养板中 MSCs 贴壁, Neurobasal 培养液的组成成分为 2% B27 + 链霉素 100 U/ml + 青霉素 100 U/ml + TSA10 ng/ml + L-谷氨酰胺 2 mmol/L + ATRA1 μ g/ml, 继续培养, 将不诱导对照组设立起来, 定期半量换液, 1 次/3 d。诱导培养 MSCs 2 周后用 4% 多聚甲醛对其进行 1 d 的固定, 用 BM88 抗体及 Neurofilament-200 神经丝蛋白(神经细胞标志蛋白 NF-200)进行免疫荧光染色, 对 MSCs 向神经细胞分化的效果进行鉴定。

2 结果

2.1 鼻黏膜中 MSCs 的分布特征

Vimentin 抗体及 Nestin 抗体免疫荧光染色成人下鼻黏膜冷冻切片显示, 双标记的阳性细胞为卵圆形或圆形, 在鼻黏膜固有层中广泛分布。具体见图 1、2。

2.2 鼻黏膜中 MSCs 的生长特性及免疫荧光染色结果

在 Corning 培养瓶中接种鼻腔呼吸黏膜细胞 3 d 后大部分细胞已贴壁。细胞在培养早期随着传代次数增加逐渐向长梭形转变, 集落样生长, 呈扁平多边形, 其排列方向在大量细胞将瓶底铺满的情况下基本一致。免疫荧光染色结果显示干细胞标志蛋白 Sall4、CD133、Nestin、Vimentin 受传代培养的 MSCs 表达(图 3~8)。

2.3 鼻黏膜 MSCs 向成骨细胞诱导分化结果

钙结节的茜素红染色结果: 茜素红染色在向成骨细胞诱导培养鼻黏膜 MSCs 2 周后显示有大量红色钙结节存在于细胞表面, 没有显著钙结节存在于未经诱导的 MSCs 表面, 只有少量茜素红着色; 碱性磷酸酶染色结果: 碱性磷酸酶染色在向成骨细胞诱导培养鼻黏膜 MSCs 2 周后呈紫蓝色, 未经诱导的 MSCs 具有极浅的染色(图 9~12)。

2.4 鼻黏膜 MSCs 向神经细胞诱导分化结果

用神经诱导培养液进行 2 周的诱导后, 细胞向神经细胞样显著分化, 可见大部分细胞呈 BM88 与 NF-200 免疫染色阳性, 细胞将多根细长突起发出并相互连接, 对照组细胞具有极弱的荧光染色, 为长梭形。具体见图 13~16。

3 讨论

3.1 MSCs 的多向分化潜能

3.1.1 向成骨细胞分化 现阶段, 很多相关医学研究均对 MSCs 分化为成骨细胞进行了报道, 诱导分化过程中通常采用地塞米松、抗坏血酸等基础诱导培养液。近年来, 随着临床不断深入研究发现在分化过程中很多因素均对其造成了直接而深刻的影响。MSCs 的成骨分化及增殖在体外培养条件下会受到一些生长因子的影响。相关学者将不同浓度的重组人转化生长因子加入基础诱导培养液中^[11], 对来源于骨髓的 MSCs 进行体外诱导, 使其向成骨细胞分化, 结果表明, 来源于成人骨髓的 MSCs 的增殖作用与重组人转化生长因子 D 呈剂量依赖关系, 在对来源于骨髓的成人 MSCs 进行诱导的过程中将重组人转化生长因子 D 加入基础诱导培养液充分利用起来, 随着重组人转化生长因子 p1 浓度的提升, 同一时间不同浓度下碱性磷酸酶活性逐渐增加。同一浓度不同时间点比较, 来源于骨髓的 MSCs 碱性磷酸酶活性随着时间的延长而增加, 达到高峰的时间为第 12 天, 之后逐渐降低。还有相关医学学者认为^[12], CD105⁺ 和转化生长因子相互作用会在一定程度上影响 MSCs 的增殖与分化, 对间充质干细胞分化为成骨细胞与脂肪细胞进行抑制, 在成脂诱导体系中为 MSCs 增殖提供良好的前提条件。另有学者对第 7 代来源于骨髓的 MSCs 增殖与分化为成骨细胞过程中地塞米松与成纤维细胞生长因子 2 的作用及二者联合应用的效应进行了研究^[13], 发现纤维细胞生长因子 2 能够为 MSCs 增殖及向未成熟的成骨细胞分化提供良好的前提条件, 同时对地塞米松诱导 MSCs 向成熟的成骨细胞分化进行拮抗, 地塞米松属于一种有效的成骨细胞分化诱导剂, 发生这一现象的原因为其虽然不会在极大程度上作用于间充质干细胞增殖, 但是能够促进纤维细胞生长因子 2 对 MSCs 促增殖效应的增强, 使 MSCs 向成熟的成骨细胞分化, 促进钙化结节的形成。

3.1.2 向神经细胞分化 相关研究证实^[14], 在体

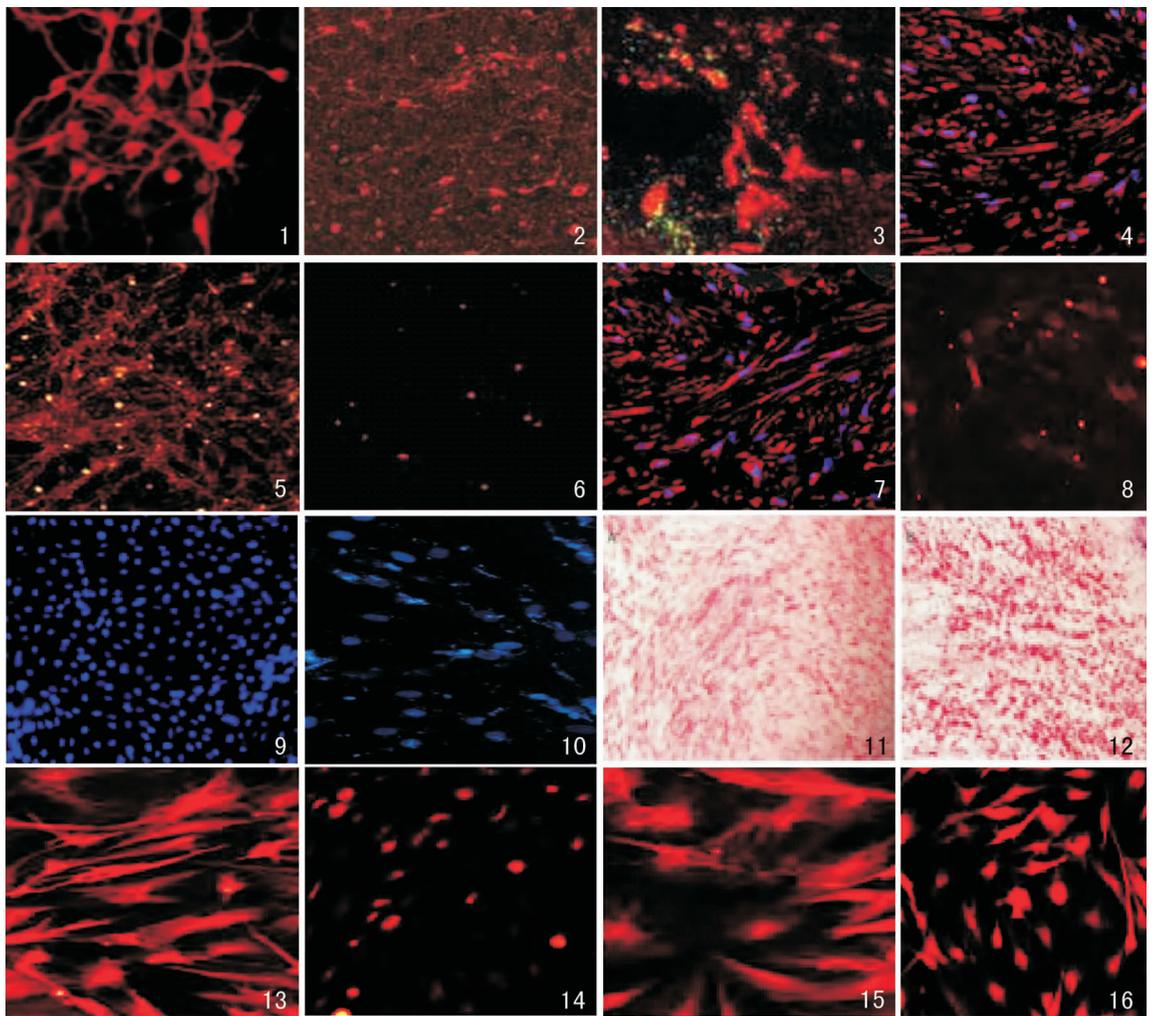


图1 鼻黏膜固有层中 Nestin 免疫荧光(Cy3)染色阳性 EMSCs 的分布 ($\times 400$) 图2 鼻黏膜固有层中 Vimentin 免疫荧光(Cy3)染色阳性 EMSCs 的分布 ($\times 400$) 图3 原代鼻黏膜 EMSCs 体外培养的倒置显微镜照片 (免疫荧光染色 $\times 400$) 图4 第5代鼻黏膜 EMSCs 体外培养的倒置显微镜照片 (免疫荧光染色 $\times 400$) 图5 第5代鼻黏膜 EMSCs 体外培养的 Nestin 免疫荧光(Cy3)染色结果 ($\times 400$) 图6 第5代鼻黏膜 EMSCs 体外培养的 CD33 免疫荧光(Cy3)染色结果 ($\times 400$) 图7 第5代鼻黏膜 EMSCs 体外培养的 Vimentin 免疫荧光(Cy3)染色结果 ($\times 400$) 图8 第5代鼻黏膜 EMSCs 体外培养的 Sall4 免疫荧光(Cy3)染色结果 ($\times 400$) 图9 成骨诱导后的鼻黏膜 EMSCs 碱性磷酸酶染色结果 ($\times 400$) 图10 未经诱导的鼻黏膜 EMSCs 碱性磷酸酶染色结果 ($\times 400$) 图11 成骨诱导后的鼻黏膜 EMSCs 茜素红染色结果 ($\times 400$) 图12 未经诱导的鼻黏膜 EMSCs 茜素红染色结果 ($\times 400$) 图13 鼻黏膜 EMSCs 的 BM88 免疫荧光(Cy3)染色结果(向神经诱导分化 $\times 400$) 图14 鼻黏膜 EMSCs 的 BM88 免疫荧光(Cy3)染色结果(未经诱导 $\times 400$) 图15 鼻黏膜 EMSCs 的 NF-200 免疫荧光(Cy3)染色结果(向神经诱导分化 $\times 400$) 图16 鼻黏膜 EMSCs 的 NF-200 免疫荧光(Cy3)染色结果(未经诱导 $\times 400$)

外小鼠皮肤组织中的 MSCs 在条件培养液诱导下能够向神经元分化,从而将一定的依据提供给临床的细胞治疗。

3.1.3 向心肌细胞分化 相关学者向免疫缺陷鼠的心脏中注射人骨髓 MSCs^[15],发现 MSCs 向心肌样细胞分化,同时将一定的心肌标志物表达了出来。研究表明^[16],移植骨髓细胞术后 9 d 新形成的心肌细胞占据了梗死区 68% 区域,以此认为骨髓细胞局部输注能够分化为心肌细胞,进而对冠状动脉疾患

症状进行有效改善。

3.1.4 向其他组织分化 研究表明^[17],MSCs 还能够分化为肝细胞上皮细胞、骨骼肌细胞。成体肝细胞均具有极为广阔的临床应用前景,发生这一现象的原因为其具有多向分化潜能。

3.2 成人鼻腔呼吸黏膜内 MSCs 的分化特征及其多向诱导分化潜能

MSCs 属于一种成体干细胞,具有多向分化潜能,在人体广泛分布,在对组织损伤进行移植修复的

过程中,自体 MSCs 的临床应用前景极为广阔。但是,如果 MSCs 来源于骨髓等中胚层组织,那么其就会自然分化向中胚层细胞分化,细胞在体外培养扩增过程中会逐渐老化,同时具有越来越弱的分化潜能^[18]。EMSCs 属于一种特殊的 MSCs,在头面部分布,从胚胎时期的神经嵴起源。因此,和来源于中胚层组织的 MSCs 相比,EMSCs 具有较早的起源。如果 EMSCs 从牙髓及牙周组织中来源,那么其就能够向神经细胞及成骨细胞诱导分化^[19]。从这里我们可以看出,鼻腔呼吸黏膜固有层中也有多向分化潜能的 EMSCs 存在。本研究结果表明,Vimentin 抗体及 Nestin 抗体免疫荧光染色成人下鼻甲黏膜冷冻切片显示,双标记的阳性细胞为卵圆形或圆形,在鼻黏膜固有层中广泛分布。在 Corning 培养瓶中接种鼻腔呼吸黏膜细胞 3 d 后大部分细胞已贴壁。细胞在培养早期随着传代次数增加逐渐向长梭形转变,集落样生长,呈扁平多边形,其排列方向在大量细胞将瓶底铺满的情况下基本一致。免疫荧光染色结果显示干细胞标志蛋白 Sall4、CD133、Nestin、Vimentin 受传代培养的 MSCs 表达。Vimentin 属于 MSCs 标志蛋白,Prominin-1 (CD133) 与 Nestin 属于神经干细胞标志蛋白。EMSCs 对 Vimentin、CD133、Nestin 高表达说明该细胞具有 MSCs 与神经干细胞双重特性^[20]。Sall4 属于多能干细胞转录因子,能够对 Sox2、Oct4 等其他多能转录因子表达进行调节,同时对干细胞特性进行有效维持^[21]。

本研究结果还表明,茜素红染色在向成骨细胞诱导培养鼻黏膜 MSCs 2 周后显示有大量红色钙结节存在于细胞表面,没有显著钙结节存在于未经诱导的 MSCs 表面,只有少量茜素红着色;碱性磷酸酶染色在向成骨细胞诱导培养鼻黏膜 MSCs 2 周后呈紫蓝色,未经诱导的 MSCs 具有极浅的染色。用神经诱导培养液进行 2 周的诱导后,细胞向神经细胞样显著分化,可见大部分细胞呈 BM88 与 NF-200 免疫染色阳性,细胞将多根细长突起发出并相互连接,对照组细胞具有极弱的荧光染色,为长梭形。BM88 能够为神经细胞分化成熟提供良好的前提条件,又称细胞周期退出神经分化蛋白^[22];TSA 属于一种组蛋白去乙酰化酶抑制剂,能够将 BM88 表达上调^[23];NF-200 属于一种成熟神经细胞的细胞骨架蛋白。BM88 与 NF-200 同时表达说明 EMSCs 能够向成熟的神经细胞分化^[24]。从这里我们可以看出,鼻黏膜 EMSCs 具有多向分化潜能,如果向不同组织的损伤部位移植体外培养扩增的 EMSCs,那么在局

部微环境诱导下,该细胞就会向损伤部位的组织细胞分化,从而对局部的细胞缺损进行填补。从总体上来说,EMSCs 广泛存在于成人鼻腔呼吸部黏膜固有层中,能够对于干细胞特性及多向分化潜能进行保持,同时在体外培养与扩增。鼻腔呼吸黏膜比含有嗅鞘细胞及神经干细胞的嗅黏膜比较具有更为方便的取材,同时不会损伤嗅觉等,发生这一现象的原因为其具有较大的面积,包括中、下鼻甲及相应的鼻道等。如果 EMSCs 来源于鼻腔呼吸黏膜,那么其就能够对骨损伤、神经损伤等多种组织损伤进行自体移植修复。对鼻黏膜 EMSCs 的生物学特性进行进一步探讨一方面能够将重要的理论依据提供给该细胞的临床应用,另一方面还能够将重要的应用依据提供给该细胞的临床应用^[25]。

3.3 MSCs 的多向分化机制

①异质性学说。认为有非中胚层谱系的细胞亚群存在于骨髓基质细胞中。研究表明^[26],MSCs 的特定亚群能够对 Sca-1 与 PDGFR α 进行表达,同时对神经嵴标记 Mpz、Snail2、Twist 等进行表达,但是造血标记 TER119 与 CD45 缺乏。相关研究证实^[27-28],体内一些 MSCs 从神经嵴细胞来源,同时,人星形胶质细胞在特定培养条件下能够向间质样细胞分化,一些情况下甚至能够向脂肪细胞及骨细胞分化;②胚胎干细胞残存学说。Verfaillie 研究小组在 2002 年将一种非造血干细胞从鼠骨髓中分离了出来,即多潜能成体祖细胞 (MAPCs),向囊胚注入能够将所有 3 个胚层细胞分离出来,同时对 SSEA-1 及 Oct4 进行低表达,其中 SSEA-1 仅表达于胚胎早期细胞,对 80 代后端粒进行扩增几乎具有相同的长度,现阶段还不确定该细胞是在骨髓中残留的胚胎样肝细胞,还是去分化 MSCs 样细胞而表现出的更高分化潜能。该研究小组在 2007 年向被照射鼠体中移植 MAPCs,发现其能够将造血祖细胞的所有成分产生出来,同时将造血细胞重建起来。有学者在 2004 年将类似亚群从骨髓中分离了出来^[29-30],即 MIAMI 细胞,该细胞能够对胚胎干细胞标志 Rex-1 与 Oct4 进行表达,同时还能够向 3 个胚层细胞分化,扩增至少 50 代,端粒酶存在于所有培养液中。从这里我们可以看出,可能有早期胚胎样干细胞存在于骨髓中。

总之,成人鼻腔呼吸黏膜内 MSCs 广泛存在,具有多向诱导分化潜能,在对骨与软组织损伤进行自体移植修复的过程中可以作为种子细胞得到有效应用,期待临床进一步验证。

参考文献:

- [1] 贺露. 犬根尖牙乳头干细胞的分离培养及鉴定[D]. 南昌:南昌大学,2015.
He L. Isolation, culture and identification of canine papillary stem cells from canine apical teeth[D]. Nanchang: Nanchang University, 2015.
- [2] 贺清华. 大鼠鼻黏膜外胚间充质干细胞的干细胞特性研究及其在治疗脊髓损伤中的应用[D]. 镇江:江苏大学,2015.
He QH. Stem cell characteristics of rat nasal mucosal ectodermal mesenchymal stem cells and their application in the treatment of spinal cord injury [D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2015.
- [3] 王磊. 诱导胎盘来源间充质干细胞向成牙骨质细胞分化的实验研究[D]. 济南:山东大学,2015.
Wang L. A experimental study on differentiation of placental-derived mesenchymal stem cells into cementoblasts [D]. Jinan: Shandong University, 2015.
- [4] 周冠洲. 基于自组装纳米多肽及脂肪间充质干细胞3D打印组织模型的研究[D]. 济南:山东大学,2017.
Zhou GZ. Study on 3D Printing Tissue Model of Self-assembled Nanopeptide and Adipose Mesenchymal Stem Cells [D]. Jinan: Shandong University, 2017.
- [5] 常玉巧. nanog 和 CD73 在心成纤维细胞向心肌分化中的作用机制[D]. 武汉:华中科技大学,2015.
Chang YQ. Mechanisms of nanog and CD73 in cardiac fibroblast differentiation into myocardium[D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2015.
- [6] 孙翔. 长链非编码 RNA 在人骨髓间充质干细胞成骨分化中差异表达的研究[D]. 广州:南方医科大学,2015.
Sun X. A study on differential expression of long-chain non-coding RNA in osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells [D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2015.
- [7] 薛德挺. 间充质干细胞复合多孔支架修复骨与软骨缺损的实验性研究[D]. 杭州:浙江大学,2015.
Xue DT. An experimental study on repairing bone and cartilage defects with mesenchymal stem cells and porous scaffolds [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2015.
- [8] 吴增城. Galectin-3 诱导大鼠骨髓间充质干细胞肝样分化过程中 Wnt/ β -catenin 的表达特征[D]. 广州:南方医科大学,2016.
Wu Zengcheng. Wnt/ β -catenin expression during liver-like differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells induced Galectin-3 [D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2016.
- [9] 孔德晓. 间充质干细胞及胰岛素分泌细胞治疗糖尿病的临床及应用基础研究[D]. 济南:山东大学,2015.
Kong Dexiao. Basic clinical and applied research of mesenchymal stem cells and insulin secreting cells in the treatment of diabetes mellitus [D]. Jinan: Shandong University, 2015.
- [10] 李鹏涛,杨晓楠,霍艳丽,等. 黄芪联合骨髓间充质干细胞治疗阿尔茨海默病的新思路[J]. 神经药理学报,2016,6(2):31-36.
Li PT, Yang XN, Huo YL, et al. New ideas of Astragalus membranaceus combined with bone marrow mesenchymal stem cells in the treatment of Alzheimer's disease [J]. Acta Neuropharmacologica, 2016, 6 (2): 31-36.
- [11] 阮征,王莲芳,胡修忠,等. 新生猪骨髓间充质干细胞衍生细胞的分离、培养及生物学特性分析[J]. 生物技术通报,2015,16(6):170-176.
Ruan Z, Wang LF, Hu XZ, et al. Isolation, Culture and Characterization of Derived Cells from Neonatal Porcine Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells [J]. Biotechnology bulletin, 2015, 16 (6): 170-176.
- [12] 尚玉攀,吴昊,曾晓丽,等. 从脊柱内镜手术摘除组织中分离髓核间充质干细胞及其生物学特征鉴定[J]. 中国病理生理杂志,2017,33(6):1147-1152.
Shang YP, Wu H, Zeng XL, et al. Isolation and identification of nucleus pulposus mesenchymal stem cells from tissues removed by percutaneous endoscopic lumbar discectomy [J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2017, 33 (6): 1147-1152.
- [13] Fan G, Xu Z, Hu X, et al. miR-33a hinders the differentiation of adipose mesenchymal stem cells towards urothelial cells in an inductive condition by targeting β catenin and TGFR [J]. Mol Med Rep, 2018, 17(2): 2341-2348.
- [14] Wang H, Liu C, Liu X, et al. MEIS1 Regulates Hemogenic Endothelial Generation, Megakaryopoiesis, and Thrombopoiesis in Human Pluripotent Stem Cells by Targeting TAL1 and FLI1 [J]. Stem Cell Reports, 2018, 10(2): 447-460.
- [15] Radenkovic G, Radenkovic D, Velickov A. Development of interstitial cells of Cajal in the human digestive tract as the result of reciprocal induction of mesenchymal and neural crest cells [J]. J Cell Mol Med, 2018, 22(2): 778-785.
- [16] Derjac-Aram \check{c} AI, Sarafoleanu C, Manea CM, et al. Regenerative potential of human schneiderian membrane: progenitor cells and epithelial-mesenchymal transition [J]. Anat Rec (Hoboken), 2015, 298(12): 2132-2140.
- [17] Rahpeyma A, Khajehahmadi S, Khalife HH. Decellularized human Schneiderian membrane: electron microscopic study as a bioscaffold and preliminary cell seeding [J]. Pathol Res Pract, 2014, 210(12): 965-970.
- [18] Ayala-Grosso CA, Pieruzzini R, Diaz-Solano D, et al. Amyloid- α Peptide in olfactory mucosa and mesenchymal stromal cells of mild cognitive impairment and Alzheimer's disease patients [J]. Brain Pathol, 2015, 25(2): 136-145.
- [19] Dumitru CA, Hemeda H, Jakob M, et al. Stimulation of mesenchymal stromal cells (MSCs) via TLR3 reveals a novel mechanism of autocrine priming [J]. FASEB J, 2014, 28(9): 3856-3866.
- [20] Liu J, Chen Q, Zhang Z, et al. Fibrin scaffolds containing ectomesenchymal stem cells enhance behavioral and histological improvement in a rat model of spinal cord injury [J]. Cells Tissues Organs, 2013, 198(1): 35-46.
- [21] Lindsay SL, Johnstone SA, Mountford JC, et al. Human mesenchymal stem cells isolated from olfactory biopsies but not bone enhance CNS myelination in vitro [J]. Glia, 2013, 61(3): 368-

382.

- [22] Nivet E, Vignes M, Girard SD, et al. Engraftment of human nasal olfactory stem cells restores neuroplasticity in mice with hippocampal lesions[J]. *J Clin Invest*, 2011,121(7):2808-2820.
- [23] Reinshagen H, Auw-Haedrich C, Sorg RV, et al. Corneal surface reconstruction using adult mesenchymal stem cells in experimental limbal stem cell deficiency in rabbits[J]. *Acta Ophthalmol*, 2011, 89(8):741-748.
- [24] Delorme B, Nivet E, Gaillard J, et al. The human nose harbors a niche of olfactory ectomesenchymal stem cells displaying neurogenic and osteogenic properties[J]. *Stem Cells Dev*, 2010,19(6):853-866.
- [25] Albera C, Polak JM, Janes S, et al. Repopulation of human pulmonary epithelium by bone marrow cells: a potential means to promote repair[J]. *Tissue Eng*, 2005,11(7-8):1115-1121.
- [26] Gruber R, Kandler B, Fuerst G, et al. Porcine sinus mucosa holds cells that respond to bone morphogenetic protein (BMP)-6 and BMP-7 with increased osteogenic differentiation in vitro[J]. *Clin Oral Implants Res*, 2004,15(5):575-580.
- [27] Wang H, Zhao S, Barton M, et al. Reciprocity of Action of Increasing Oct4 and Repressing p53 in Transdifferentiation of Mouse Embryonic Fibroblasts into Cardiac Myocytes[J]. *Cell Reprogram*, 2018,20(1):27-37.

- [28] Al Madhoun A, Alkandari S, Ali H, et al. Chemically Defined Conditions Mediate an Efficient Induction of Mesodermal Lineage from Human Umbilical Cord-and Bone Marrow-Mesenchymal Stem Cells and Dental Pulp Pluripotent-Like Stem Cells[J]. *Cell Reprogram*, 2018,20(1):9-16.
- [29] Jakob M, Hemeda H, Janeschik S, et al. Human nasal mucosa contains tissue-resident immunologically responsive mesenchymal stromal cells[J]. *Stem Cells Dev*, 2010,19(5):635-644.
- [30] Cho KS, Park HY, Roh HJ, et al. Human ethmoid sinus mucosa: a promising novel tissue source of mesenchymal progenitor cells[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2014,5(1):15.

(收稿日期:2018-09-13)

本文引用格式:郭照萌,侯铁奇.成人鼻腔呼吸黏膜间充质干细胞的分化特征及其多向诱导分化潜能研究[J].中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,2019,25(4):412-418. DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.201904016

Cite this article as: GUO Zhao-meng, HOU Tie-qi. Differentiation characteristics and multiple differentiation potential of adult mesenchymal stem cells (MSCs) in nasal and respiratory mucosa[J]. *Chin J Otorhinolaryngol Skull Base Surg*, 2019,25(4):412-418. DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.201904016

(上接第411页)

- [16] 王向东,韩德民,周兵,等.上下呼吸道炎症反应相关性研究[J].*中华耳鼻咽喉科杂志*,2003,38(4):247-250.
Wang XD, Han DM, Zhou B, et al. A study of the link between upper and lower respiratory inflammation[J]. *Chinese Journal of Otorhinolaryngology*,2003,38(4):247-250.
- [17] Tatar M, Petriskova J, Zucha J, et al. Induce sputum eosinophils bronchial reactivity and cough sensitivity in subjects with allergic rhinitis[J]. *J Physiol Pharmacol*,2005,56(Suppl 4):227-236.
- [18] Gibson PG, Fujimura M, Niimi A. Eosinophilic bronchitis: clinical manifestations and implications for treatment[J]. *Thorax*, 2002,57(2):178-182.
- [19] Yang MS, Lee HS, Kim MH, et al. Rhinitis patients with sputum eosinophilia show decreased lung function in the absence of airway hyperresponsiveness[J]. *Allergy Asthma Immunol Res*,2013,5(4):232-238.
- [20] Denburg JA, Sehmi R, Saito H, et al. Systemic aspects of allergic disease: Bone marrow responses[J]. *Allergy Clin Immunol*,2000,106(5 Suppl):S242-S246.
- [21] Kim SW, Han DH, Lee SJ, et al. Bronchial hyperresponsiveness

in pediatric rhinitis patients: the difference between allergic and nonallergic rhinitis[J]. *Am J Rhinol Allergy*,2013,27(3):e63-e68.

- [22] 季俊峰,王秋萍,张勇,等.变应性鼻炎患者下气道异常特征研究[J].*中华结核呼吸杂志*,2016,39(11):856-861.
Ji JF, Wang QP, Zhang Y, et al. Lower airway abnormalities in patients with allergic rhinitis[J]. *Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases*, 2016,39(11):856-861.

(收稿日期:2018-01-09)

本文引用格式:马莉,吴昆旻,李泽卿,等.变应性鼻炎患者鼻部炎症与下气道炎症相关性研究[J].中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,2019,25(4):407-411,418. DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.201904015

Cite this article as: MA Li, WU Kun-min, LI Ze-qing, et al. Association between inflammation of nose and lower airway in patients with allergic rhinitis[J]. *Chin J Otorhinolaryngol Skull Base Surg*, 2019,25(4):407-411,418. DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.201904015