DOI:10.16016/j.1000-5404.201606066

线粒体转录因子A对表皮干细胞生物学功能的调节作用

袁 希,李世荣,柴琳琳,曹 川,毕 胜 (400038 重庆,第三军医大学西南医院整形美容科)

[摘要] **目的** 探讨下调线粒体转录因子A(mitochondrial transcription factor A,TFAM,也称为mTFA)对人表皮干细胞(epidermal stem cell,ESC)增殖、凋亡等的影响。**方法** 将TFAM基因干扰慢病毒转染至ESC中,得到目标ESC为干扰组,并取对照病毒转染ESC作为对照组。对比分析两组中ESC的增殖与克隆成型率、凋亡以及端粒酶反转录酶表达水平等生物学特征的差异。**结果** 两组比较,干扰组ESC克隆形成率及凋亡均显著高于对照组,而增殖率显著低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);在细胞端粒酶反转录酶水平测定中,两组均为阳性,但干扰组经定量分析,其平均光密度与阳性面积值均显著低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** TFAM基因的沉默可导致ESC体外增殖活性降低,促进其凋亡过程,通过增加克隆形成效率而利于维持干细胞特性,并可能进一步抑制创面的愈合。

[关键词] 线粒体转录因子A;人表皮干细胞;慢病毒;线粒体
[中图法分类号] R322.991;R329.28;R394.2 [文献标志码] A

Effects of silencing mitochondrial transcription factor A on regulation of biological functions in mouse epidermal stem cells

Yuan Xi, Li Shirong, Chai Linlin, Cao Chuan, Bi Sheng (Department of Plastic and Aesthetic Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effects of silencing mitochondrial transcription factor A (TFAM, also named as mTFA) on regulation of proliferation and apoptosis of epidermal stem cells (ESCs). **Methods** Lentiviral vector harboring RNAi sequence to target TFAM gene was constructed, and injected into ESCs by transgenesis to establish TFAM gene silencing model as experimental group. ESCs without target gene silencing was used as control group. The rates of proliferation, clone formation, and apoptosis as well as expression level of telomerase reverse transcriptase in the ESCs of the 2 groups were compared. **Results** We observed that the growth of ESCs in both groups were adhered to the wall. Compared to the control group, ESCs in the experimental group had higher colony forming efficiency and apoptotic rate but a lower proliferation rate, which all reached statistical significance ($P<0.05$). The expression of telomerase reverse transcriptase was positively detected in the ESCs of both groups. Quantitative analysis showed that the average value of absorbance and positive area was significantly lower in the experimental group compared to the control group. **Conclusion** TFAM gene silencing can lead to declined proliferation ability and enhanced apoptosis of ESCs *in vitro*. It can also maintain the properties of ESCs through increased efficacy of colony formation, which may inhibit the wound healing.

[**Key words**] mitochondrial transcription factor A;epidermal stem cells;lentivirus;mitochondria

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (81301639) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2013jcyjA10138). Corresponding author: Li Shirong, E-mail: lishirong.cqzx@yahoo.com.cn

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金(81301639);重庆市自然科学基金(CSTC2013jcyjA10138)
[通信作者] 李世荣,E-mail: lishirong.cqzx@yahoo.com.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160901.0854.006.html(2016-09-01)

目前临床上各类创伤、烧伤及糖尿病顽固性皮肤溃疡等造成的广泛皮肤组织缺损仍没有良好的治疗方法。近年来国内外及我们前期的研究均发现,人表皮干细胞(epidermal stem cell,ESC)拥有强大的自我更新、增殖与分化的潜能等特点[1-2],且在促进创面愈合过程中扮演重要角色,因此研究 ESC 特性已成为国内外的焦点。通过前期研究结果提示线粒体缺失在 ESC 生物学特征及相关疾病研究中具有重要作用[3],我们认为 TFAM 基因可能通过对细胞线粒体的调控在 ESC 的特征中扮演着重要角色,因此,我们此次研究期望观察 TFAM 通过影响线粒体功能,进一步起到调节 ESC 细胞特性的作用。实验将前期构建的 TFAM 基因沉默慢病毒[4]转染至 ESC 中,通过与慢病毒对照组 ESC 的比较,观察 TFAM 与 ESC 生物学特征之间的关联,为进一步研究 ESC 增殖及凋亡等机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 资料及试剂

标本取材于 2014 年 6 -9 月第三军医大学西南医院泌尿外科包皮环切术患者,患者年龄均小于18 岁,经患者及家属知情同意,并经伦理委员会批准后取做实验研究用。主要试剂包括:DK-SFM 培养基及 Dispase Ⅱ溶液(Gibco 公司),人胎盘Ⅳ型胶原(Sigma 公司),鼠抗人 β1-integrin 单克隆抗体、鼠抗人角蛋白 K19 单克隆抗体及鼠抗人 TERT 抗体(Abcam 公司),山羊抗鼠荧光二抗、山羊抗鼠 HRP 标记二抗、DAPI 及 Western blot 试剂盒(碧云天),TRIzol (Invitrogen 公司),RT-PCR kit(TaKaRa 公司),兔抗 Caspase-3 多克隆抗体、CCK-8 kit(广州锐博生物),鼠抗 GAPDH 抗体(上海康成)。

1.2 方法

1.2.1 ESC 的分离培养及鉴定 所有标本的获取均获得患者知情同意并签署了知情同意书,采用Ⅳ型胶原快速黏附法对 ESC 进行分离培养。在无菌条件下将新鲜取材的人包皮组织修剪为约 0.5 cm × 1 cm 大小的皮片,0.25% Dispase Ⅱ溶液 4 ℃消化过夜,分离表皮与皮下组织,收集表皮,PBS 清洗,0.05% 胰蛋白酶-0.02% EDTA 溶液 37 ℃消化 15 min,200 目滤网过滤后,细胞接种于Ⅳ型胶原包被的培养瓶,加入 DK-SFM(含 10% 胎牛血清)于 37 ℃ 5% CO_2 孵箱传代培养。采用免疫荧光两步法标记 ESC 表面标志物 β1-integrin 及 K19,对 ESC 进行鉴定[5]。

1.2.2 慢病毒转染 ESC 并检测 TFAM 干扰效率 采用磷酸钙共沉淀法转染 293FT 细胞制备得到实验用慢病毒,进行超速离心法纯化浓缩。将 ESC 接种于 24 孔板中,每孔中加入 5×10^4 细胞和 500 μL DK-SFM 培养基,次日,感染前更换新鲜培养基,然后将所需慢病毒直接加入培养基中,24 h 后更换新鲜培养基,继续培养 48 h 后,即可在细胞中观察到绿色荧光蛋白(GFP)表达。病毒感染后第 10 天取样,采用 TRIzol 法提取细胞 RNA,测量浓度后取 0.8 μg RNA 按照 TaKaRa 逆转录试剂盒说明书进行逆转录和 qPCR 检测。TFAM 的引物:上游 5′- CAAAGGATGATTCGGCTCAG-3′,下游 5′-AAGCTGAATATATGCCTGCTTTTC-3′;GAPDH 的引物:上游 5′-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3′,下游 5′-TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG-3′。

1.2.3 病毒感染后 ESC 表面标志物 β1-integrin 和 K19 的表达 收集第 2 代 ESC 细胞,PBS 冲洗 2 次,计数并离心,使其为 1×10^5 细胞/管,1% Triton 孵育 25 min,PBS 冲洗 2 次,用含 1% BSA 的 PBS 稀释抗体,室温孵育 30 min,PBS 冲洗 2 次,用含 1% BSA 的 PBS 稀释二抗,冰上避光孵育 20 min,4% PFA 室温固定细胞 20 min,PBS 冲洗 2 次后 FACS 检测表达荧光细胞数目。

1.2.4 观察体外 ESC 的增殖能力 采用第 2 代 ESC 将细胞接种于 96 孔板,100 μL/孔,即 2×10^3 个/孔,边缘孔用无菌 PBS 填充,5% CO_2、37 ℃孵育 2 ~ 10 d,倒置显微镜下观察细胞状态。按 CCK-8 kit 说明书操作并于全波长酶标仪上测量 450 nm 处各孔的光密度值[D(450)],记录结果。

1.2.5 ESC 体外克隆形成率的变化 取干扰组及对照组中的第 2 代 ESC,病毒处理 10 d 后,用Ⅳ型胶原快速黏附法将 ESC 以 200 ~ 500/皿接种于直径 100 mm 的培养皿中,置于 37 ℃、5% CO_2 孵箱培养 2 周。4% 多聚甲醛固定,Giemsa 染色后显微镜下观察,以克隆内细胞数≥32(2^5)个为一个克隆,连续观察并记录克隆形成数。克隆形成率 = 克隆数/接种细胞数 × 100%。

1.2.6 端粒酶反转录酶表达水平检测 使用 EnVision 两步法对第 2 代经病毒处理 10 d 的 ESC 细胞按照产品说明书进行端粒酶反转录酶(TERT)免疫细胞化学染色,分别取两组染色玻片,使用 HPIAS-1000 彩色高清晰度病理分析报告系统进行相应图像分析,除去背景色后随机取 5 个视野,对其阳性细胞与光密度进行测定,并求得平均阳性面积(S)和平均光密度(A)。

1.2.7 ESC 的凋亡检测 RIPA 裂解液提取细胞蛋白,冰上裂解 10 min,4 ℃ 14 000 × g 条件下离心 5 min,取上清即得总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度后取 30 μg 蛋白加入上样缓冲液,于 100 ℃沸水浴中变性 5 min,冷却后上样电泳,转膜,5% 脱脂奶粉于室温封闭 1 h,Caspase-3 一抗 4 ℃过夜,二抗室温 1.5 h,化学发光试

剂盒显色后凝胶成像仪检测。

将 ESC 以 1×10^5 个/孔接种于 6 孔板中,干扰组与对照组各组重复 3 孔。收集各组细胞加入结合液 195 μL 混匀 ,加入 FITC-Annexin V 5 μL 避光反应 10 min,加入适量 PBS 离心清洗取沉淀后, 加入结合液 190 μL 混匀 ,加入 PI 10 μL , 30 min 内流式细胞仪(FACSCalibur , 美国 BD 公司) 检测。

1.3　统计学分析

使用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 t 检验。计数资料用百分比(%)表示,采用卡方检验,组间比较采用单因素方差分析。

2　结果

2.1　ESC 体外培养及鉴定

采用Ⅳ型胶原快速黏附法可有效将 ESC 从角质形成细胞中分离出来,ESC 可在体外进行培养扩增并保持干细胞基本特性,可在以后 ESC 的研究中表达稳定的干细胞特性。倒置相差显微镜观察示,快速黏附于Ⅳ型胶原的细胞群细胞呈圆形,分散较均匀,细胞体积较小,细胞核大,核质比大,折光率较强;孵育 3 d 后,细胞贴壁牢固并形成明显克隆,符合 ESC 特征(图 1)。通过免疫荧光染色观察,能够检测出 β1-integrin 和 K19 两种表面标志物(图 2),且表达明显荧光,说明本实验培养方法有效,可利用细胞体外培养得到 ESC,为进一步研究细胞的特性奠定了基础。

2.2　ESC 的慢病毒转染及干扰效率的鉴定

如图 3 所示转染 48 h 后在 293FT 细胞中观察到明显的绿色荧光,干扰组与对照组 293FT 细胞形态无明显变化。将在 293FT 细胞内包装的慢病毒进行浓缩纯化后可高效感染 ESC,并可在 ESC 中稳定高效的表达,为我们下一步研究 TFAM 下调对 ESC 功能的调控打下了基础。并通过实时荧光定量 PCR 检测干扰组 ESC 和对照组 ESC 的 TFAM 基因表达水平,其干扰效率超过 83%。

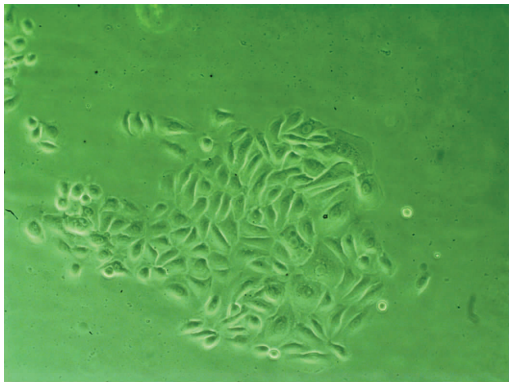


图 1　倒置相差显微镜观察 ESC 形态学变化　(×100)

2.3　慢病毒感染 ESC 后 β1-integrin 和 K19 表达的变化

经慢病毒感染的 ESC 在体外培养 10 d,通过流式细胞仪分别计数观察干扰组 ESC 和对照组 ESC 中表达 β1-integrin 和 K19 的荧光标记细胞比例,如图 4 所示两组 ESC 均能够检测出两种表面标志物,但干扰组 β1-integrin 和 K19 阳性细胞均分别高于对照组($P<0.05$),提示 TFAM 基因下调会利于 ESC 保持未分化状态和维持干性,可能减少分化的发生。

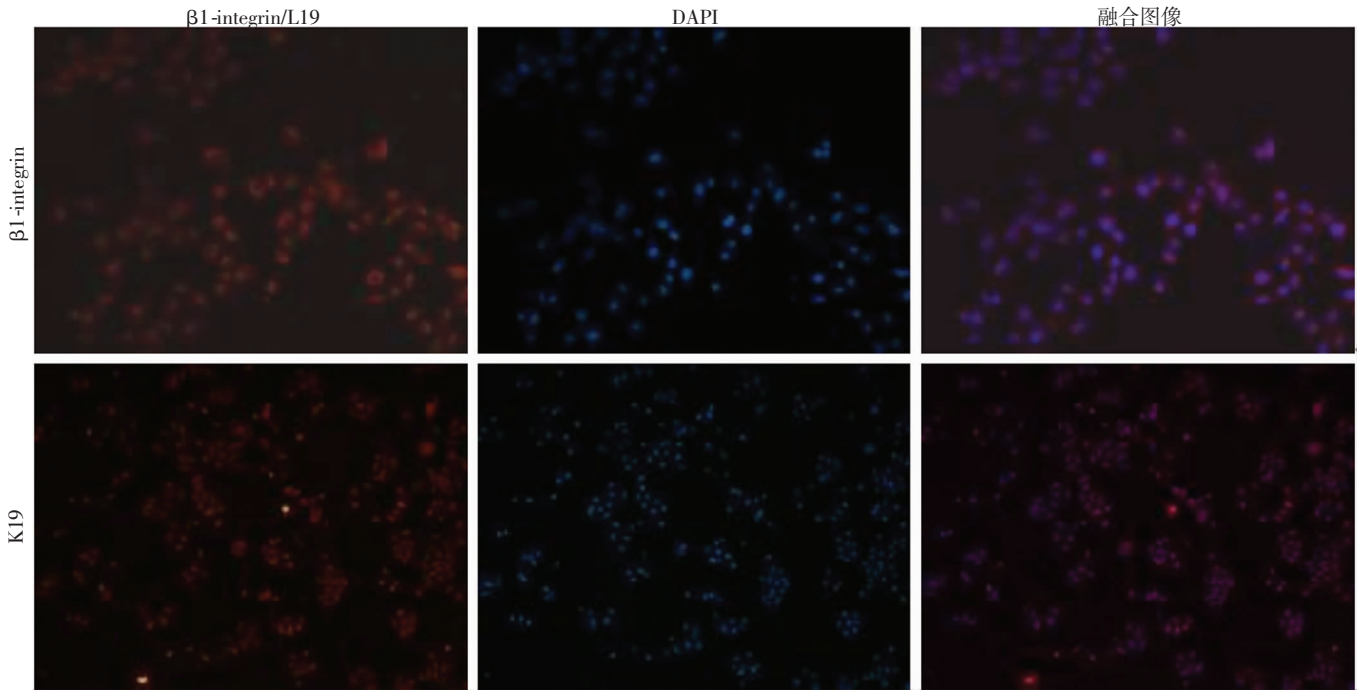


图 2　β1-integrin 和 K19 免疫荧光染色鉴定 ESC　(荧光显微镜×100)

表 1　TFAM 干扰对不同培养时间 ESC 增殖的影响(Ab 值)

组别	2 d	4 d	6 d	8 d	10 d
对照组	0.073 ±0.002	0.140 ±0.006	0.289 ±0.035[a]	0.568 ±0.066[a]	0.686 ±0.042[a]
干扰组	0.074 ±0.002	0.084 ±0.002	0.091 ±0.03	0.104 ±0.007	0.137 ±0.008

a: $P<0.05$,与干扰组比较

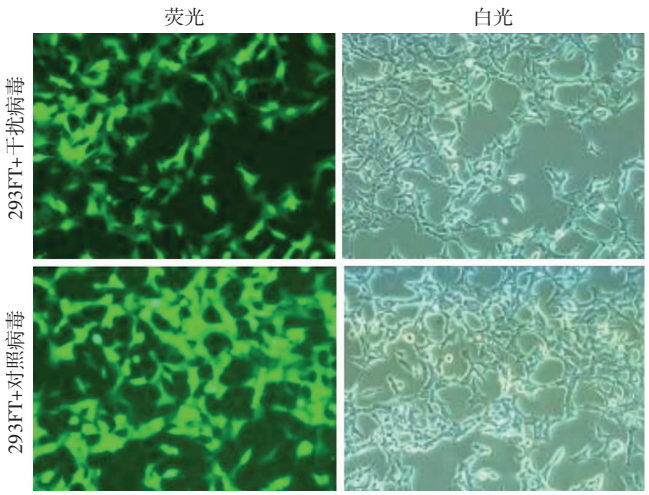
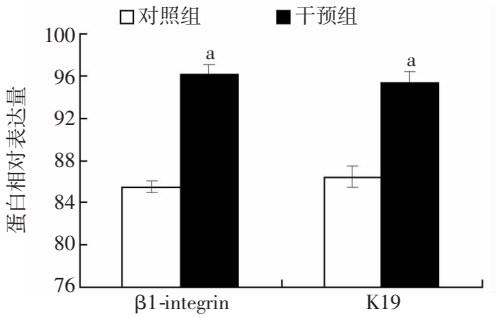


图 3　荧光显微镜观察转染 48 h 后 293FT 细胞的变化
(×100)



a:$P<0.05$,与对照组比较

图 4　FACS 检测 ESC 表面 β1-integrin 和 K19 的表达

2.4　TFAM 对 ESC 增殖能力的影响

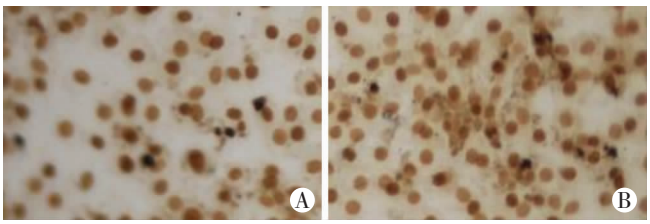
将慢病毒感染的 ESC 在体外进行较短时间(10 d)的培养,采用 CCK-8 法隔日检测,以观察干扰组 ESC 和对照组 ESC 的生长增殖变化,如表 1 所示随着培养时间的延长细胞数量逐渐增多,在第 4 ~ 8 天时增殖较快,第 8 ~ 10 天受培养条件限制增殖变缓。培养 2 d 后慢病毒开始表达并发挥干扰作用,第 4 天时干扰组 ESC 增殖率开始下降,且培养至第 6、8 天和第 10 天均出现统计学差异($P<0.05$);结果提示,慢病毒干扰 TFAM 基因后 ESC 生长增殖能力明显降低。

2.5　观察 ESC 克隆形成率的变化

经过筛选后,显微镜下连续观察 10 d 两组 ESC,并每天记录 ESC 的克隆数量,按照公式统计比较克隆形成率。经统计学比较发现干扰组 ESC 克隆形成率[(56.5 ±1.7)%]比对照组[(25.8 ±4.1)%]高,差异有统计学意义($P<0.05$)。进一步说明下调 TFAM 基因表达后,更加有利于 ESC 保持干细胞特性,减少分化事件的发生。

2.6　ESC 端粒酶反转录酶表达水平比较

两组人 ESC 端粒酶反转录酶表达均为阳性,干扰组人 ESC 端粒酶反转录酶表达呈弱阳性,对照组人 ESC 端粒酶反转录酶表达呈强阳性。对其表达进行定量分析,结果显示:干扰组平均光密度低于对照组,阳性面积值也低于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$,图 5,表 2)。结果证明,下调 TFAM 后,ESC 中端粒酶反转录酶表达受到抑制,且其表达水平与 TERT 正性相关。



A:干扰组;B:对照组

图 5　免疫细胞化学染色检测两组端粒酶反转录酶表达
(EnVision 两步法 ×100)

表 2　两组人 ESC 中 TERT 表达水平比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

组别	平均光密度(A)	阳性面积值(S)
干扰组	0.078 ±0.025[a]	1 387.84 ±456.80[a]
对照组	0.112 ±0.035	1 854.05 ±425.15

a: $P=0.000$,与对照组比较

2.7　ESC 凋亡检测结果

Western blot 检测凋亡相关蛋白表达的变化,结果显示:干扰组 ESC 中 Caspase-3 的表达高于对照组 ESC(图 6)。用 Quantity one 软件计算条带灰度值,并用 Caspase-3 与 GAPDH 的比值作为相对表达值,统计 3 次重复的结果显示干扰组 ESC 中 Caspase-3 的表达(1.22 ±0.08)与对照组 ESC(0.40 ±0.02)相比差异具有统计学意义($P<0.05$),说明下调 TFAM 蛋白表达,对 ESC 凋亡具有促进作用。

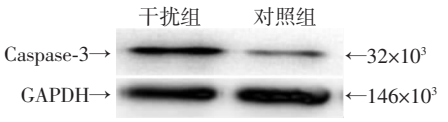
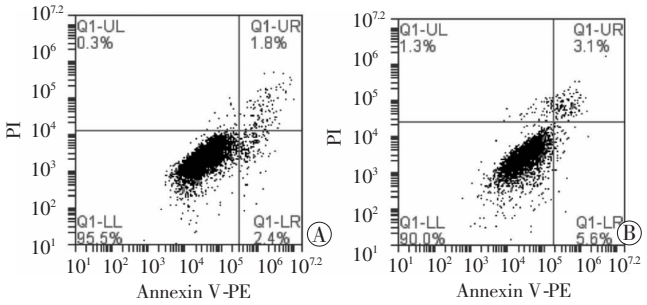


图 6 Western blot 检测两组 ESC 中 Caspase-3 蛋白的表达

AnnexinV-PI 染色流式细胞仪检测细胞凋亡如图 7,重复 3 次流式细胞仪检测结果后统计分析:对照组 ESC 的凋亡率为(1.30±0.12)%,干扰组 ESC 的凋亡率为(4.00±0.15)%,其差异具有统计学意义($P<0.01$),同 Western blot 检测结果一致,说明 TFAM 基因干扰后促进了 ESC 的凋亡。



A:对照组;B:干扰组

图 7 流式细胞仪检测两组 ESC 凋亡的变化

3 讨论

ESC 作为皮肤基底层的一群细胞,是一种具有周期性慢、克隆形成率高、增殖能力强和多能分化等显著特性的皮肤组织特异性干细胞。在体外环境中寿命较短,容易发生干细胞特征丢失而进入终末分化阶段,细胞的增殖、克隆形成率及凋亡等是反映 ESC 生长情况的重要生物学特征[6]。

通过前期研究结果提示线粒体缺失在 ESC 生物学特征及相关疾病研究中具有非常重要的作用[7]。随着 ESC 逐渐成为国内外的研究热点,关于线粒体对其生物学特征影响的研究显得尤为迫切[8]。而线粒体转录因子 A(mitochondrial transcription factor A,TFAM)是调节线粒体基因复制和转录的主要调控因子[9],参与了线粒体的转录激活,保护线粒体不受氧化应激影响,在改善线粒体功能方面发挥了一定的作用。因此,我们推测 TFAM 基因可能通过对细胞线粒体的调控在 ESC 的特征中扮演着重要角色,但其对于 ESC 生物学特征的影响尚不十分清楚。

本研究通过慢病毒转染对 TFAM 基因沉默的人 ESC 的干细胞生物学特性进行观察。结果表明,干扰组 ESC 下调 TFAM 基因表达水平后,其干细胞增殖比例低于对照组,这与 Flores 等[10]研究结果相符;其克隆形成率和干细胞标志物阳性比例均高于对照组,说明下调 TFAM 基因有利于保持 ESC 的特性,并可能避免分化事件的发生。提示 TFAM 基因的正常表达有助于维持其生物学特征、调控其增殖水平、延长其寿命,而 TFAM 基因的沉默可导致人的 ESC 体外增殖活性降低,凋亡率增加。

染色体末端端粒(由重复 DNA 序列 TTAGGG 组成)的序列丢失,已被公认为与细胞的老化、凋亡有关[11]。细胞每次分裂,该段端粒均会发生 50~200 bp 的丢失,而当其缩短至一定程度,染色体就无法受其保护而免受重组与降解,使细胞分裂控制点得到信号并停止分裂,最终进入老化、死亡的过程。染色体末端端粒主要由 RNA、端粒酶相关蛋白以及端粒酶反转录酶组成,而后者则是端粒酶活性中的关键酶。人体端粒酶主要存在于生殖细胞、恶性肿瘤细胞、干细胞及其他有再生能力的细胞中。有研究发现,端粒酶活性与肿瘤细胞的恶性增殖能力呈正相关。而在干细胞中,端粒酶活性会随着干细胞的不断分化而逐渐降低,直至终末分化细胞。因此,维持 ESC 中端粒酶活性能够提升 ESC 的体外复制与扩增能力[12]。研究表明,TFAM 能够维持 ESC 端粒酶中的反转录酶的正常表达,可能与 TFAM 能够帮助细胞抗脂质过氧化,进而避免 DNA 损伤有关[13-15]。在本研究中,我们观察了 TFAM 基因沉默的 ESC 中的端粒酶活性,结果发现,干扰组的活性显著低于对照组,提示 TFAM 基因的沉默可通过降低端粒酶活性促进 ESC 的凋亡。同时,本实验通过对凋亡相关蛋白 Caspase-3 的半定量对比分析[16],发现下调 TFAM 基因后可以增加 ESC 的凋亡率,进一步说明 TFAM 对于维持 ESC 中端粒酶反转录酶的正常表达具有重要作用。

综上所述,TFAM 基因的沉默可导致 ESC 体外增殖活性降低,减少 ESC 的分化可能,并通过降低端粒酶活性促进其凋亡过程,其正常表达对维持人 ESC 体外增殖活性、保持干细胞的干性具有重要意义。这些研究结果将对揭示干细胞的组织再生与修复规律,进一步完善创面愈合的基础理论以及指导临床应用,提高创伤早期治愈率具有一定的指导意义。

参考文献:

[1] Lathion D G, Rochat A, Knott G, *et al*. A single epidermal stem cell strategy for safe *ex vivo*, gene therapy[J]. Embo Molecular Medicine, 2015, 7(4): 380-393. DOI: 10.

15252/emmm.201404353

[2] Duarte B, Miselli F, Murillas R, *et al*. Long-Term Skin Regeneration From a Gene-Targeted Human Epidermal Stem Cell Clone[J]. Mol Ther, 2014, 22(11): 1878 - 1880. DOI: 10.1038/mt.2014.187

[3] Liang X, Mei Y, Huang X, *et al*. Junctophilin 2, knockdown interfere with mitochondrium status in ESC-CMs and cardiogenesis of ES cells [J]. J Cell Biochem, 2012, 113(9): 2884 - 2894. DOI:10.1002/jcb.24164

[4] Lee E J,Kang Y C,Park W H, *et al*. Negative transcriptional regulation of mitochondrial transcription factor A (TFAM) by nuclear TFAM[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 450(1): 166 - 171. DOI:10.1016/j.bbrc.2014.05.082

[5] 郭锐, 曹川, 王珍祥,等. SDF-1 通过活化 PKC-ζ 趋化人表皮干细胞定向迁移的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(4): 335 - 338. DOI: 10.16016/j.1000-5404.2011.04.005

[6] Lenihan C, Rogers C, Metcalfe A D, *et al*. The effect of isolation and culture methods on epithelial stem cell populations and their progeny—toward an improved cell expansion protocol for clinical application[J]. Cytotherapy, 2014, 16(12): 1750 - 1759. DOI:10.1016/j.jcyt.2014.06.005

[7] Toyokuni S, Li J, Wang S, *et al*. Aging rather than sun exposure is a major determining factor for the density of miR-125b -positive epidermal stem cells in human skin[J]. Pathol Int, 2015, 65(8): 415 - 419. DOI:10.1111/pin.12320

[8] Baris O R, Klose A, Kloepper J E, *et al*. The Mitochondrial Electron Transport Chain Is Dispensable for Proliferation and Differentiation of Epidermal Progenitor Cells [J]. Stem Cells, 2011, 29(9): 1459 - 1468. DOI:10.1002/stem.695

[9] Chandrasekaran K, Anjaneyulu M, Inoue T, *et al*. Mitochondrial Transcription Factor A Regulation of Mitochondrial Degeneration in Experimental Diabetic Neuropathy[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2015, 309(2): E132 - E141. DOI:10.1152/ajpendo.00620.2014

[10] Flores I, Cayuela M L, Blasco M A. Effects of telomerase and telomere length on epidermal stem cell behavior[J]. Science,2005, 309(5738): 1253 - 1256. DOI:10.1126/science.1115025

[11] 吴珊,刘宗石,吴秉铨. 端粒和端粒酶与癌症[J]. 中华病理学杂志, 1998, 27(5): 386 - 387.

[12] Iyer S, Xiao E, Alsayegh K, *et al*. Mitochondrial gene replacement in human pluripotent stem cell-derived neural progenitors[J]. Gene Therapy, 2011, 19(5): 469 - 475. DOI:10.1038/gt.2011.134

[13] Collu-Marchese M, Shuen M, Pauly M, *et al*. The regulation of mitochondrial transcription factor A (Tfam) expression during skeletal muscle cell differentiation[J]. Bioscience Reports, 2015, 35(3): e00221. DOI: 10.1042/BSR20150073

[14] Kasashima K, Endo H. Interaction of human mitochondrial transcription factor A in mitochondria: its involvement in the dynamics of mitochondrial DNA nucleoids[J]. Genes to Cells, 2015, 20(12): 1017 - 1027. DOI: 10.1111/gtc.12306

[15] Lenihan C, Rogers C, Metcalfe A D, *et al*. The effect of isolation and culture methods on epithelial stem cell populations and their progeny-toward an improved cell expansion protocol for clinical application[J]. Cytotherapy, 2014,16(12): 1750 - 1759. DOI:10.1016/j.jcyt.2014.06.005

[16] Chen L, Li H, Li C, *et al*. Active ingredients of Plastrum Testudinis inhibit epidermal stem cell apoptosis in serum-deprived culture[J]. Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao, 2011, 9(8): 888 - 893. DOI:10.3736/jcim20110811

(收稿:2016-06-14;修回:2016-07-12)

(编辑 邓强庭)