DOI:10.16016/j.1000-5404.201908194-黄玉婷-ok

内源性过表达Nestin对NIH3T3细胞增殖、迁移及MAPK信号传导通路的影响

［摘要］ **目的** 通过在成纤维细胞NIH3T3中内源性过表达巢蛋白(Nestin),研究其对细胞增殖、迁移及转化生长因子(TGF-β1)作用下细胞胶原蛋白表达与MAPK相关通路的影响。**方法** 通过CRISPR/SAM技术构建内源性过表达Nestin的细胞株,用MTS实验、Western blot检测细胞增殖能力,细胞划痕实验检测细胞迁移能力,经qPCR、Western blot与免疫荧光染色明确TGF-β1对其胶原蛋白与MAPK通路的影响。**结果** CRISPR/SAM技术能使内源性Nestin表达显著提高($P<0.05$),而内源性过表达Nestin对NIH3T3细胞的生长、迁移有明显促进作用($P<0.05$),对TGF-β1诱导的胶原蛋白表达及MAPK的激活也有明显的抑制效应($P<0.01$)。**结论** 用CRISPR/SAM技术内源性过表达Nestin可以明显促进NIH3T3细胞的生长和迁移,但却抑制TGF-β1诱导下胶原蛋白的表达及MAPK的激活。

［关键词］ Nestin;NIH3T3;CRISPR/SAM;增殖;迁移;MAPK

［文献标志码］ A

Effects of endogenous nestin overexpression on proliferation, migration and MAPK signal transduction pathway in NIH3T3 cells

-HUANG Yuting, DONG Jinling, FENG Liyuan, LI Peng Department of Pharmacognosy and Traditional Chinese Medicine, College of Pharmacy and Laboratory Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing 400038, China

［**Abstract**］ Objective To observe the effects of endogenous nestin overexpression on the proliferation and migration and transforming growth factor β (TGF-β1)-induced expressions of collagen and MAPK-related pathway in NIH3T3 fibroblasts. Methods CRISPR/SAM technique was used to construct a nestin-overexpressing cell line in NIH3T3 fibroblasts. The effects of nestin overexpression on cell proliferation and migration were evaluated using MTS assay, immunoblotting and scratch-wound assay. Quantitative PCR, immunoblotting and immunofluorescence staining were used to determine the effect of nestin overexpression on TGF-β-induced expression of collagen and activation of MAPK pathway in the fibroblasts. Results CRISPR/SAM significantly increased the expression of endogenous nestin in NIH3T3 fibroblasts ($P<0.05$), and nestin overexpression significantly promoted the growth and migration of NIH3T3 cells ($P<0.05$). Nestin overexpression obviously inhibited the expression of collagen and the activation of MAPK in TGF-β1-induced cells ($P<0.01$). Conclusion Endogenous overexpression of nestin achieved by CRISPR/SAM technique significantly promotes the growth and migration of NIH3T3 cells and inhibits TGF-β1-induced expression of collagen and activation of MAPK.

［**Key words**］ nestin; NIH3T3; CRISPR/SAM; proliferation; migration; mitogen-activated protein kinase

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81472596). Corresponding author.: LI Peng, E-mail: pengli@tmmu.edu.cn

黄玉婷,董金玲,冯力元,李 鹏 400038 重庆,陆军 军医大学(第三军医大学)药学与检验医学系生药学与

［基金项目］ 国家自然科学基金面上项目(81472596)

［通信作者］ 李 鹏,E-mail: pengli@tmmu.edu.cn

中药学教研室

巢蛋白(Nestin)是一种VI型中间丝蛋白,首次被发现在多能神经干细胞(neural stem cells,NSCs)中,与NSCs的自我更新关系密切[1]。尽管Nestin已经广泛应用于神经系统各个区域中NSCs的标记与部分肿瘤的病理检查,但对于其具体功能与作用机制的研究尚不完善,其中的部分原因是由于神经细胞体外长期培养与基因干预具有相当难度。近年的研究表明除神经细胞与部分肿瘤外,Nestin在皮肤、心脏、胰腺、肾脏及血管内皮中均有表达[2],尤其大鼠中Nestin阳性的心室成纤维细胞在心肌受损后明显增高,参与组织损伤后的瘢痕形成[3]。不论是原代还是建株成纤维细胞的传代培养方法已经成熟,且成纤维细胞具有转化成为神经干细胞的潜能[4],因此成纤维细胞可以作为良好的载体研究Nestin的功能。

Nestin的分子量较大(240×10^3),具有N端较短,C端长的特殊结构[5],构建其过表达病毒载体,难以保证病毒的得率与滴度,而常规过表达克隆载体又存在筛选周期长且由于插入基因组DNA位置的随机性所导致目的蛋白表达不稳定的问题,需要采用更加方便、稳定的过表达技术应用于本实验。协同激活介导因子(synergistic activation mediator, SAM)技术[6]是在规律成簇间隔短回文序列/CRISPR相关蛋白9(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated proteins 9, CRISPR/Cas9)基因敲除基础上发展起来的过表达内源基因的新技术,其优势在于能够激活分子量较大的内源蛋白高效表达,可以控制一个启动子支配的各种转录本表达,由于细胞可以容纳多个小向导RNA(single guide RNA,sgRNA),所以在一个细胞内可同时调控多种蛋白的表达,有利于研究蛋白间的相互作用。

本研究利用CRISPR/SAM技术构建了内源性过表达Nestin质粒系统,并利用其调控成纤维细胞NIH3T3中内源性Nestin的表达,初步研究了Nestin的过表达对NIH3T3细胞增殖、迁移及TGF-β1诱导下细胞胶原蛋白表达与MAPK信号传导通路激活的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

NIH3T3,293T细胞(购自中国科学院细胞库);SAM系统:lentiSAMv2、lentiMPHv2质粒自Addgene引进;病毒包装Δ8.9(Packaging plasmid)及VSVG(Envelope plasmid)质粒由实验室保存;Stbl3感受态细菌(购自博迈德公司);PEG6000(购自BIOSHARP);氯喹(购自Sigma公司);DPBS(购自BI);BsmBI(购自Biolabs);T_4 DNA Ligase(购自Promega);TRIzol(购自北京鼎国公司);HiScript®IIRT SuperMix逆转录试剂盒(R222-01,购于Vazyme);AceQ® qPCR SYBR试剂盒(Q111-03/02,购于Vazyme);MTS试剂(购自Promega);TGF-β1(购自novoprotein);Nestin抗体(ab11306,Abcam);PCNA抗体(10205-2-AP,武汉三鹰);MAPK抗体(201246-4F3,成都正能);Phospho-MAPK抗体(301245,成都正能);α-Tubulin抗体(66031-1-1g,武汉三鹰);β-Actin抗体(66009-1-1g,武汉三鹰);CollagenIII抗体(22734-1-AP,武汉三鹰);CollagenI抗体(66761-1-1g,武汉三鹰);Alexa Fluor 488标记山羊抗小鼠IgG(SA0006-1,武汉三鹰)。

1.2 方法

1.2.1 LV-sgRNA-MS2-P65-HSF1-Neo质粒构建 首先利用哈佛大学Zhang Lab网上设计软件(网址:http://sam.genome-engineering.org/),获得7条sgRNA序列,根据文献[7]获得小鼠Nestin靶基因上游调控序列及转录起始位点(Transcriptional Start Site,TSS)相关信息,分别选择距TSS 34、77bp与150bp的3段sgRNA序列(序列信息见表1),加上*Bsm*BI位点切割后产生的互补粘端后,合成寡核苷酸(表2),经退火处理形成双链DNA。SAM系统采用哈佛大学Zhang Lab lentiSAMv2/ lentiMPHv2双质粒系统[8](来自哈佛大学Feng Zhang博士,Addgene plasmid # 75112与# 89308)。通过*Bsm*BI酶切、回收与连接,将退火sgRNA片段连入lentiSAMv2载体。经转化、菌落PCR、测序,获得序列正确的表达sgRNA的慢病毒质粒(图1)。

表1 Zhang Lab在线引导RNA设计结果

基因名	基因库编码	转录起始位点	引导序列
Nes	NM_016701	150	ATCAAATTGTAGCCTCGCCC
Nes	NM_016701	77	CTCTAAAGGGTTAAGGCCTA
Nes	NM_016701	34	GTATTCATACTCCCGCCGGC

表2 合成的sgRNA寡核苷酸序列

编号		接头	sgRNA序列	接头
Nes #1	正义链	CACCg	ATCAAATTGTAGCCTCGCCC	c
	反义链	aaac	GGGCGAGGCTACAATTTGAT	
Nes #2	正义链	CACCg	CTCTAAAGGGTTAAGGCCTA	c
	反义链	aaac	TAGGCCTTAACCCTTTAGAG	
Nes #3	正义链	CACCg	GTATTCATACTCCCGCCGGC	c
	反义链	aaac	GCCGGCGGGAGTATGAATAC	

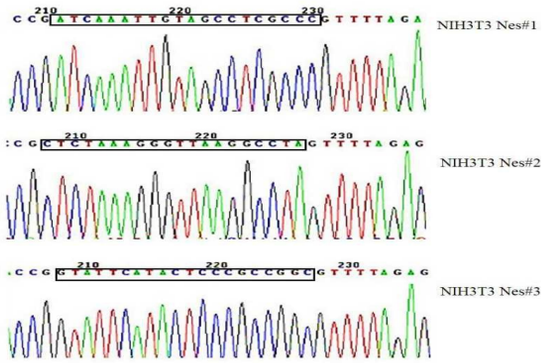


图1 内源性过表达Nestin LV-sgRNA-MS2-P65-HSF1-Neo质粒构测序

1.2.2 病毒的包装、浓缩与滴度检测 过表达病毒的包装、纯化及滴度测定主要按照文献[9]的方法进行：以293T细胞作为包装细胞；辅助质粒采用Δ8.9(Packaging plasmid)及VSVG(Envelope plasmid)，按照Envelope质粒：Packaging质粒：Transfer质粒(μg)=1:2:3的比例混合质粒，利用磷酸钙法进行转染，收集培养48h后上清液，过滤后以PEG6000进行病毒的浓缩。采用293T细胞进行药筛实验对病毒滴度进行检测，通过记录抗性药物处理24h后活细胞数量，利用公式：病毒滴度=活细胞数/病毒原液量，计算病毒的滴度。

1.2.3 内源性过表达Nestin细胞株构建与细胞培养 NIH3T3细胞在10%灭活小牛血清，1% NEAA，1%抗生素，88% DEME高糖，37℃、5% CO_2环境中培养。NIH3T3细胞加入LentiMPH病毒感染24h，以含200μg/mL潮霉素(Hygromycin)培养基连续筛选2周，获稳定细胞后，将细胞分为4组，分别用Nes-sgRNA #1、Nes-sgRNA #2、Nes-sgRNA #3和对照病毒(Nes-sgRNA con)进行感染，利用含10μg/mL杀稻瘟菌素(Blasticidin)和200μg/mL潮霉素培养基连续筛选1周，获得Nes-sgRNA con、#1、#2、#3稳定细胞株。

1.2.4 总RNA提取和qPCR 使用TRIzol提取细胞总RNA，通过NanoDrop™分光光度计定量RNA后，利用HiScript® II RT SuperMix逆转录试剂盒制备cDNA，以AceQ® qPCR SYBR试剂盒进行各种目的基因的检测检测。qPCR引物：Nestin上游5'-CCCTGAAGTCGAGGAGCTG-3'；下游5'-CTGCACCTCTAAGCGA-3'。Collagen III上游5'-CTGTAACATGGAAACTGGGGAAA-3'；下游5'-CCATAGCTGAACTGAAAACCACC-3'。mβ-actin上游5'-GGCTGTATTCCCCTCCATCG-3'；下游5'-CCAGTTGGTAACAATGCCATGT-3'。PCR程序如下：95℃预变性5min，循环反应95℃ 10 s，60℃ 30 s，40个循环，融解曲线95℃ 15s，60℃ 60s，95℃ 15s。以mβ-actin为内参，使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$方法计算相对表达量。所有实验至少进行3次。

1.2.5 Western blot检测 建株细胞采用无血清培养液饥饿过夜后，采用含/不含5ng/mL TGF-β1完全培养基进行刺激，于冰上以RIPA裂解液分别提取各组0、2、4、8、12h与24h细胞总蛋白，采用SDS-PAGE法分离蛋白，并转移至0.45μm PVDF膜，室温下5%脱脂牛奶封闭2h。然后一抗4℃过夜。二抗室温孵育2h。采用ECL底物发光法获取结果。并使用β-Actin抗体与α-Tubulin抗体为内参对照。通过image Lab软件定量蛋白质条带的灰度值。

1.2.6 免疫荧光染色 Nes-sgRNA con、#1、#3细胞接种于爬片上，经/不经5ng/mL TGF-β1刺激24h后，以4%多聚甲醛固定15min，0.5% TritonX-100通透20min，10%山羊血清封闭2h，一抗4℃过夜，二抗及DAPI染色2h，封片后以荧光显微镜拍照获取结果。

1.2.7 MTS细胞增殖检测 Nestin-sgRNA con、#1、#2、#3细胞株分别接种于96孔板中，每组设置3个复孔，每孔加入100μL培养基，37℃、5% CO_2环境中培养。于接种后24、48、72、96、120、144h向每孔中加入MTS试剂20μL，重新置于37 °C、5% CO_2孵箱中继续培养2 h后，使用酶标仪测定各孔细胞的光吸收值，设置检测波长为450nm。

1.2.8 细胞划痕实验 Nes-sgRNA con、#1、#2、#3细胞接种于24孔板。培养24 h后，用200μL移液管尖在每孔底部中间划一窄线。分别在划痕12、24h后置细胞培养板于固定位置拍照观察拍照，测量细胞向致伤区迁移的相对迁移距离，根据原始致伤区距离利用ImageJ软件计算伤口愈合面积。

1.3 统计学分析

采用SPSS 22.0统计软件，数据以$\bar{x}\pm s$表示，采用配对样本t检验，检验水准：$\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 病毒包装及高效内源性过表达NestinNIH3T3细胞的鉴定

qPCR检测所构建细胞的Nestin的表达水平，解链曲线(图2A)证实反应特异性高，qPCR检测结果显示，Nes-sgRNA #1、#2、#3和对照组con的mRNA相对表达水平为(20.30 ± 6.025)、(1.858 ± 0.634)、(29.20 ± 4.201)、(1.033± 0.152)，差异具有统计学意义($P<0.05$)，其中#1和#3表达量最高(与对照组con相比，$P<0.01$)(图2B)。Western blot检测结果显示，Nes-

sgRNA #1、#2、#3、对照组 con 的蛋白相对表达水平为(0.540 ± 0.045)、(0.036 ± 0.008)、(0.469 ± 0.030)、(0.024± 0.008),差异具有统计学意义(P<0.05),其中#1、#2、#3、对照组 con 的蛋白相对表达水平为(0.540 ± 0.045)、(0.036 ± 0.008)、(0.469 ± 0.030)、(0.024± 0.008),差异具有统计学意义(P<0.05),其中#1 和#3 表达量最高(与对照组 con 相比,P<0.01)(图 2C、D)。与 qPCR 结果相似,Nes-sgRNA#1 和#3 细胞 Nestin 相对表达量最高(与对照组 con 相比,P<0.01),后续实验选择#1 和#3 细胞继续进行。免疫荧光 IF 验证了 Nes-sgRNA #1 和#3 调控 Nestin 的表达模式,结果显示细胞模型中 Nestin 的表达与对照一致,Nestin 蛋白在细胞质表达,形成轻微弯曲的纤维,以放射状形式从核周发散出去,并发现与对照相比 Nes-sgRNA#1 和#3 细胞中 Nestin 表达更多(图 2E)。

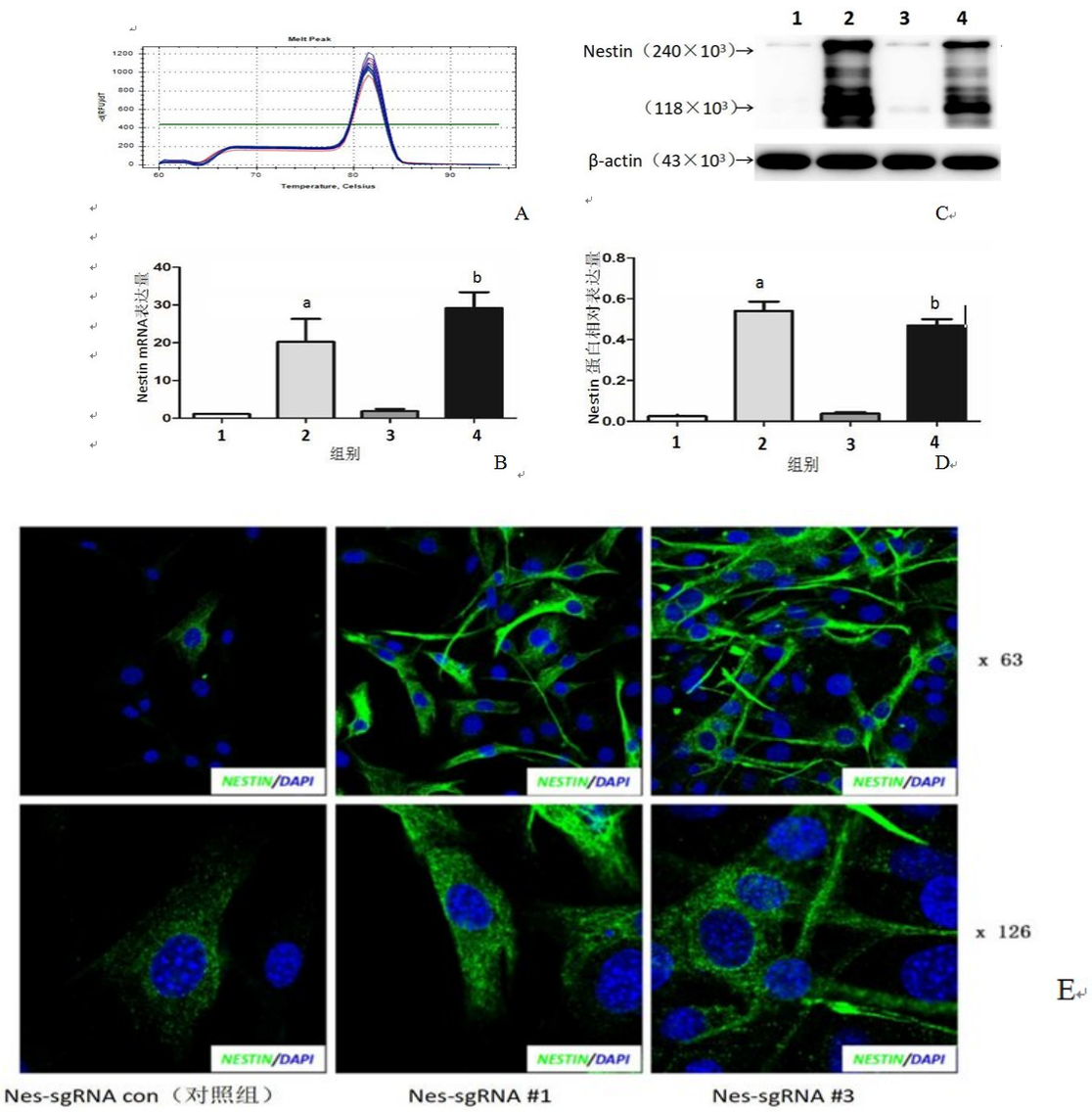


图 2 qPCR、Western blot、免疫荧光染色检测构建的细胞模型中 Nestin 的表达

2.2 内源性过表达 Nestin 对 NIH3T3 细胞增殖的影响

MTS 检测 Nes-sgRNAcon(对照组)、#1、#3 组细胞在 450nm 时的光吸收度值,绘制细胞增殖曲线。结果显示,Nes-sgRNA #1 和#3 组细胞增殖活力相对于对照组明显增高,差异具有统计学意义(P<0.05)说明 Nestin 内源性过表达后促进了细胞增殖(图 3A)。Western blot 检测结果显示,Nes-sgRNA #1、#3、对照组 con 的 PCNA 蛋白相对表达水平为(0.944 ± 0.050)、(1.237 ± 0.073)、(0.670 ± 0.054),差异具有统计学意义(P<0.05)。与增殖曲线结果相似,Nestin 内源性

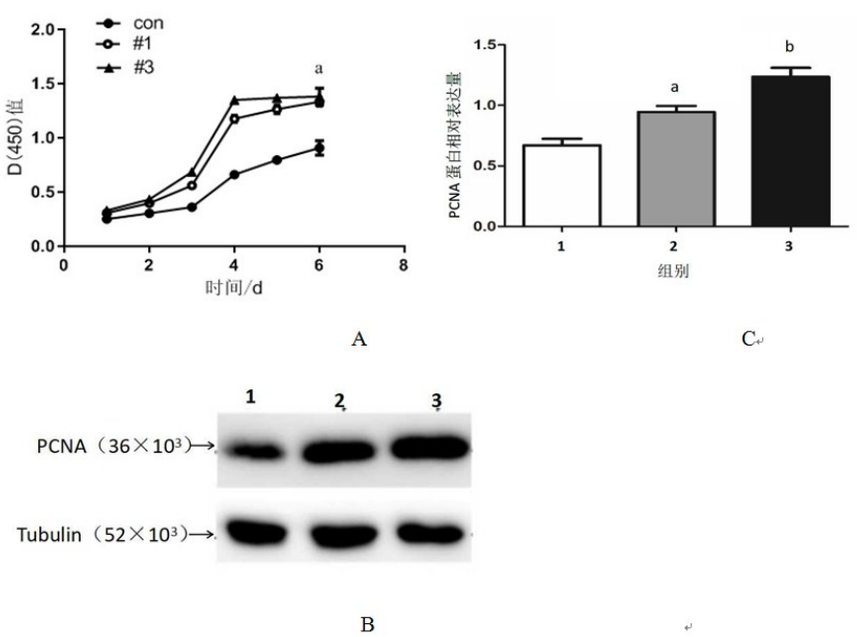
过表达后促进了#1、#3组细胞增殖。(与对照组相比$P<0.05$,图3B、C)。

2.3 内源性过表达Nestin对NIH3T3细胞迁移的影响

细胞划痕实验检测内源性过表达Nestin后成纤维细胞的侧向迁移能力,结果显示,与对照组相比,过表达内源性Nestin后成纤维细胞的迁移能力明显增强,结果表明,12h的时候,#1和#3组细胞中内源性过表达Nestin后,迁移能力更好($P<0.01$,图4)。

2.4 内源性过表达Nestin对NIH3T3细胞胶原蛋白及相关信号传导通路的影响

胶原蛋白是成纤维细胞分化的重要标志物,qPCR结果显示,Nes-sgRNA #1和对照组con的胶原蛋白III(Collagen III)mRNA相对表达水平为(0.595 ± 0.040)、(1.050 ± 0.095),差异具有统计学意义($P<0.01$),内源性Nestin的过表达将导致Collagen III表达明显下调(图5A)。TGF-β1能促进成纤维细胞的分化,免疫荧光结果显示,与对照组相比,内源性过表达Nestin后成纤维细胞经TGF-β1刺激后胶原蛋白表达的能力明显下降(图5B)。不同时相点Western blot检测的结果也证实,Nestin的过表达导致TGF-β1诱导胶原蛋白III的表达受到抑制(图5C)。由于MAPK通路的激活与成纤维细胞的分化关系密切,为了进一步明确Nestin的过表达对TGF-β1诱导下MAPK相关信号传导通路的影响,我们检测了MAPK通路相关分子ERK、JNK、P38激活的情况,结果显示:在未刺激状态下过表达内源性Nestin细胞内ERK1/2的磷酸化程度就低于对照组,而总ERK1/2表达差异无统计学意义。经TGF-β1刺激后对照组在2、4、8h几个时相点ERK1/2的磷酸化明显上调,而过表达内源性Nestin的细胞尽管ERK1/2的磷酸化也有所上升,但磷酸化的程度明显不如对照组,提示Nestin的过表达会抑制ERK1/2的磷酸化激活(图6A)。同样,TGF-β1所诱导的JNK磷酸化也明显受到抑制(图6B),但P38的激活未发现明显差异(图6C),说明Nestin的过表达会抑制MAPK信号传导通路中ERK与JNK的激活,对P38通路影响不大。



A:细胞生长曲线 1:对照组(Nes-sgRNA con);2:Nes-sgRNA #1;3:Nes-sgRNA #3;a:$P<0.05$,与对照组相比;B、C:Western blot检测三种细胞PCNA表达及半定量分析结果 1:对照组(Nes-sgRNA con);2:Nes-sgRNA #1;3:Nes-sgRNA #3;a、b:$P<0.05$,与对照组相比

图3 内源性过表达Nestin对NIH3T3细胞增殖的影响

3 讨论

本实验采用CRISPR SAM技术成功构建了内源性过表达NestinNIH3T3细胞模型。与传统的过表达技术相比,SAM技术的是在dCas9(Cas9酶突变后形成的dCas9序列,其编码的蛋白只具有结合基因组和sgRNA的能力,不能切割DNA)作用下,细胞内形成“基因组DNA-dCas9-sgRNA-MS2 binding site-MS2- P65-HSF1”

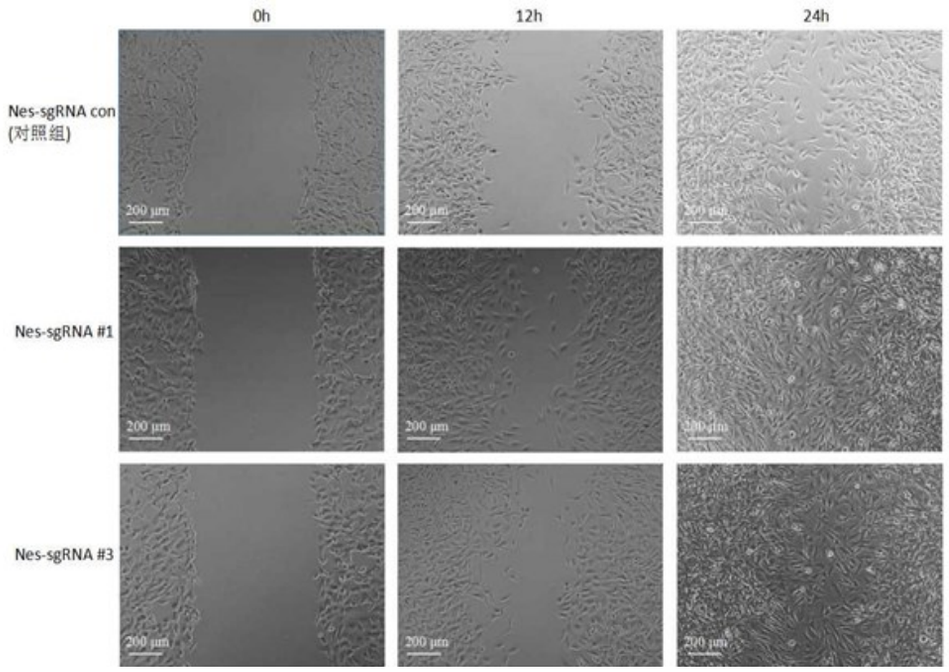


图 4　划痕实验检验 NIH3T3 细胞内源性过表达 Nestin 后对迁移的影响

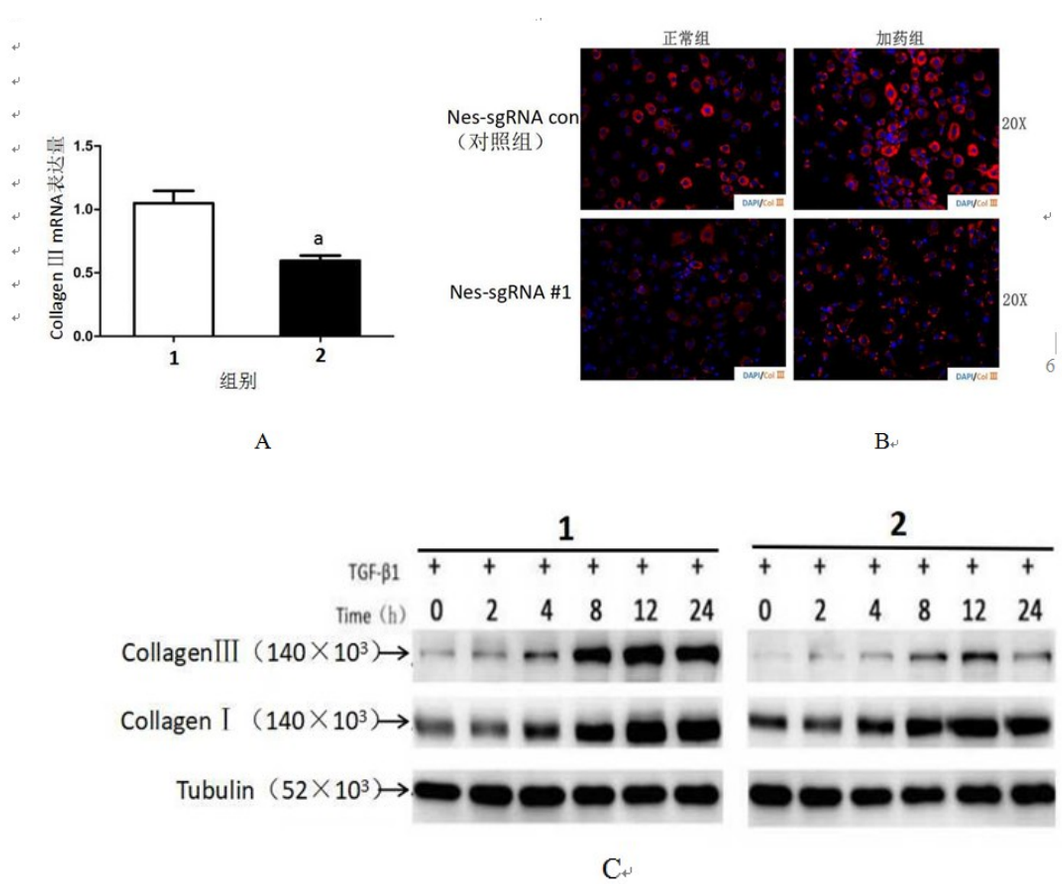
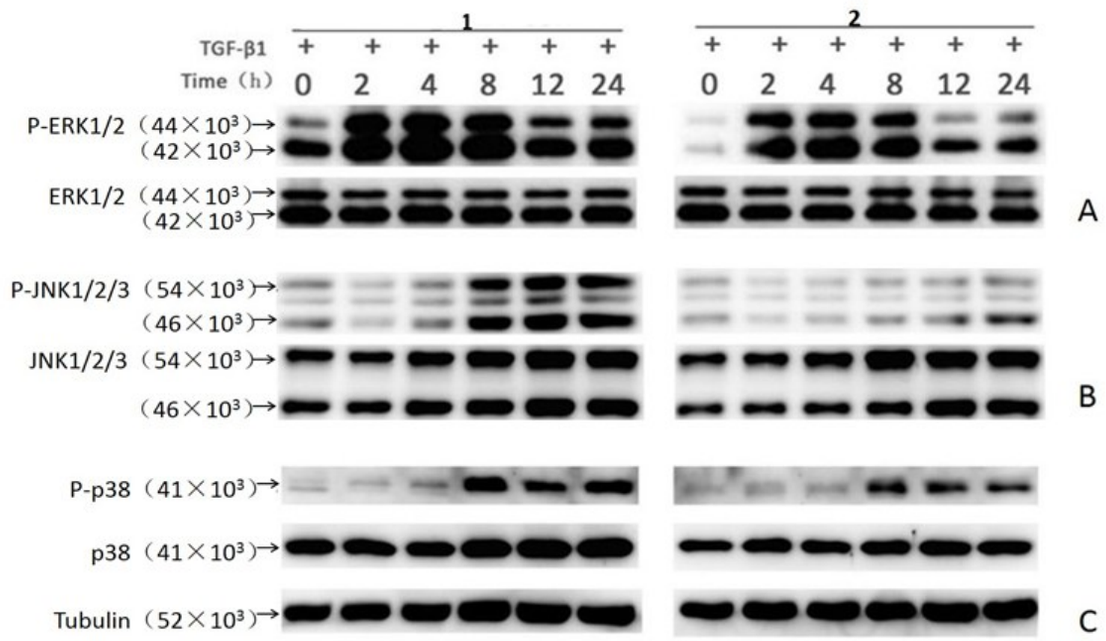


图 5　内源性过表达 Nestin 对 NIH3T3 细胞胶原蛋白的影响

复合体。当 sgRNA 设计为特定基因转录起始位点时，此超级复合体定位于转录起始位点，P65、HSF1 募集大量转录因子，启动转录，从而激活转录起始位点后面的基因表达。本实验我们利用该方法在极大提高



Western blot检测磷酸化和全长ERK表达结果 1:对照组(Nes-sgRNA con);2: Nes-sgRNA #1;B:Western blot检测磷酸化和全长JNK蛋白表达结果 1:对照组(Nes-sgRNA con);2: Nes-sgRNA #1;C:Western blot检测磷酸化和全长P38蛋白表达结果 1:对照组(Nes-sgRNA con);2: Nes-sgRNA #1;

图 6　内源性过表达Nestin对NIH3T3细胞相关信号传导通路的影响

NIH3T3内源性Nestin表达的同时,节省了Nestin基因克隆及真核表达载体构建的时间,克服了由于外源性Nestin片段插入位置的随机性所致目的基因表达不稳定,也节省了筛选稳定细胞克

隆的时间。另一方面我们也应当看到,由于本技术是

人为利用P65、HSF1招募转录因子实现目的基因的过表达,并不适合应用于靶基因本身的调控表达研究,且P65、HSF1本身对细胞的影响也应在实验设计时予以考虑。

Nestin作为一种中间丝蛋白,其表达与功能最早在神经系统中被发现与研究。正常情况下Nestin在神经系统中的表达具有严格的时空顺序,与神经细胞分化成负相关,为神经干细胞的自我更新所需[10],与细胞骨架形成、细胞信号转导、细胞器发生、细胞新陈代谢等有关[11]。近年的发现证实Nestin在机体其他组织(如胰岛、骨骼肌、睾丸、心脏等)中也存在广泛的表达[12],在这些研究中,大部分的结果证实Nestin与细胞的增殖及迁移正相关[13]。我们建立模型的研究结果提示作用Nestin对于NIH3T3细胞的与上述研究的结论一致,也能够促进成纤维细胞的增殖与迁移。有研究证实Nestin阳性细胞参与移植皮肤或愈合伤口的修复及血管生成[14],但这些Nestin阳性细胞的性质及种类并未得到准确的鉴定。由于成纤维细胞在不同程度的细胞变性、坏死和组织缺陷以及骨创伤的修复中均发挥着十分重要的作用,我们认为Nestin阳性成纤维细胞可能是参与伤口修复的重要细胞。

胶原蛋白的表达是成纤维细胞分化与发挥功能的重要标志物。我们研究发现Nestin的过表达能够抑制成纤维细胞III型胶原蛋白(CollagenIII)的表达,说明Nestin能够发挥抑制成纤维细胞分化的功能。另一方面,瘢痕组织的产生是组织修复的必然产物,而以过度的纤维化和胶原蛋白的沉积为特征的病理性瘢痕组织(增生性瘢痕和瘢痕疙瘩),是人类真皮组织所特有的一种纤维代谢性疾病。研究已经证实,瘢痕疙瘩的形成过程中,以I型胶原(CollagenI)增加为主,而增生性瘢痕I、III型胶原均明显增加。我们的研究结果提示Nestin可能会参与瘢痕形成的不同病理过程,在后期实验中需要应用临床样品进行进一步的验证。我们前期证实NIH3T3细胞中存在一定程度的Nestin表达,通过与Gli3的相互作用参与SHH通路调控[15],但关于Nestin对成纤维细胞其他信号传导通路,尤其是瘢痕

生成相关的信号传导通路影响的研究还较少见到。已知多种信号传导通路如Wnt、Notch、AKT/mTOR及MAKP与组织修复及病理性瘢痕组织的发生密切相关，而TGF-β1作为公认的致纤维化因子，是目前已知的与胶原代谢和瘢痕形成关系最为密切的细胞因子，能够诱导成纤维细胞分化，促进胶原蛋白的合成[16]。TGF-β1在病理性瘢痕形成过程中能够激活MAPK通路，抑制MAPK的激活能够抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞的增殖以及胶原合成[17-18]。MAPK可分为4个亚族：ERK、p38、JNK和ERK5，一般认为ERK参与细胞的增殖分化的调控。JNK家族参与细胞对辐射、渗透压、温度变化等应激反应。p38介导炎症、凋亡等。我们的研究证实Nestin的表达能够降低TGF-β1的转化作用，它主要影响TGF-β1诱导下MAPK中ERK与JNK通路的激活，提示Nestin可能主要参与成纤维细胞增殖与应激反应过程，可能具有促进组织修复，抑制病理性瘢痕生成作用。上述推论需要利用所建立的模型进一步证实。

综上所述，我们利用SAM技术成功建立了Nestin过表达系统，该系统稳定可靠，在此基础上我们验证了成纤维细胞中内源性Nestin的过表达会对细胞生物学性状及信号传导通路产生影响。本研究对后期进一步明确Nestin在成纤维细胞与神经干细胞的功能，尤其所影响的具体信号传导通路及相互作用分子的研究奠定了基础。

参考文献：

[1] PARK D, XIANG A P, MAO F F, *et al*. Nestin is required for the proper self-renewal of neural stem cells[J]. Stem Cells, 2010, 28(12): 2162-2171. DOI: 10.1002/stem.541.

[2] BERNAL A, ARRANZ L. Nestin-expressing progenitor cells: function, identity and therapeutic implications[J]. Cell Mol Life Sci, 2018, 75(12): 2177-2195. DOI: 10.1007/s00018-018-2794-z.

[3] CALDERONE A. The biological role of nestin(+)-cells in physiological and pathological cardiovascular remodeling[J]. Front Cell Dev Biol, 2018, 6: 15. DOI: 10.3389/fcell.2018.00015.

[4] TANG Y W, XIONG S M, YU P, *et al*. Direct conversion of mouse fibroblasts into neural stem cells by chemical cocktail requires stepwise activation of growth factors and Nup210[J]. Cell Rep, 2018, 24(5): 1355-1362. e3. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.06.116.

[5] MICHALCZYK K, ZIMAN M. Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organisation[J]. Histol Histopathol, 2005, 20(2): 665-671. DOI: 10.14670/HH-20.665.

[6] JOUNG J, KONERMANN S, GOOTENBERG J S, *et al*. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout and transcriptional activation screening[J]. Nat Protoc, 2017, 12(4): 828-863. DOI: 10.1038/nprot.2017.016.

[7] CHENG L P, JIN Z G, LIU L, *et al*. Characterization and promoter analysis of the mouse nestin gene[J]. FEBS Lett, 2004, 565(1/2/3): 195-202. DOI: 10.1016/j.febslet.2004.03.097.

[8] KONERMANN S, BRIGHAM M D, TREVINO A E, *et al*. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex[J]. Nature, 2015, 517(7536): 583-588. DOI: 10.1038/nature14136.

[9] KUTNER R H, ZHANG X Y, REISER J. Production, concentration and titration of pseudotyped HIV-1-based lentiviral vectors[J]. Nat Protoc, 2009, 4(4): 495-505. DOI: 10.1038/nprot.2009.22.

[10] DI C G, XIANG A P, JIA L, *et al*. Involvement of extracellular factors in maintaining self-renewal of neural stem cell by nestin[J]. Neuroreport, 2014, 25(10): 782-787. DOI: 10.1097/WNR.0000000000000177.

[11] NOWAK A, DZIEGIEL P. Implications of nestin in breast cancer pathogenesis (Review)[J]. Int J Oncol, 2018, 53(2): 477-487. DOI: 10.3892/ijo.2018.4441.

[12] HERTIG V, MATOS-NIEVES A, GARG V, *et al*. Nestin expression is dynamically regulated in cardiomyocytes during embryogenesis[J]. J Cell Physiol, 2018, 233(4): 3218-3229. DOI: 10.1002/jcp.26165.

[13] WANG J, CAI J, HUANG Y, *et al*. Nestin regulates proliferation and invasion of gastrointestinal stromal tumor cells by altering mitochondrial dynamics[J]. Oncogene, 2016, 35(24): 3139-3150. DOI: 10.1038/onc.2015.370.

[14] AKI R, AMOH Y, LI L N, *et al*. Nestin-expressing interfollicular blood vessel network contributes to skin transplant survival and wound healing[J]. J Cell Biochem, 2010, 110(1): 80-86. DOI: 10.1002/jcb.22512.

[15] LI P, LEE E H, DU F, *et al*. Nestin mediates hedgehog pathway tumorigenesis[J]. Cancer Res, 2016, 76(18): 5573-5583. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-16-1547.

[16] COENTRO J Q, PUGLIESE E, HANLEY G, *et al*. Current and upcoming therapies to modulate skin scarring and fibrosis[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2018: S0169-S409X(1830207-2. DOI: 10.1016/j.addr.2018.08.009.

[17] LIANG C J, YEN Y H, HUNG L Y, *et al*. Thalidomide inhibits fibronectin production in TGF-β1-treated normal and keloid fibroblasts via inhibition of the p38/Smad3 pathway

[J]. Biochem Pharmacol, 2013, 85(11): 1594-1602. DOI:10.1016/j.bcp.2013.02.038.

[18] HE T, BAI X Z, YANG L L, *et al*. Loureirin B inhibits hypertrophic scar formation via inhibition of the TGF-β1-ERK/JNK pathway[J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 37(2): 666-676. DOI:10.1159/000430385.

(收稿:2019-08-27;修回:2019-11-20)

(编辑 王 红)