

网络出版时间:2014-04-25 15:48

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.05.034

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.05.034.html>

干细胞标志分子在猪脐带组织中的表达

余树民¹, 凌占业^{1,2}, 刘 丹¹, 刘欢欢¹, 夏 娟¹, 沈留红¹, 曹随忠¹,
左之才¹, 邓俊良¹, 任志华¹, 马晓平¹, 王 娅¹, 胡延春¹

(1 四川农业大学 动物医学院, 环境公害与动物疾病四川省高校重点实验室, 四川 雅安 625014;

2 河南省黄泛区鑫欣牧业有限公司, 河南 周口 466632)

[摘 要] **【目的】**研究干细胞标志分子, 如干细胞“干性”调控关键基因及胚胎阶段特异性抗原(Stage-specific embryonic antigen, SSEA)在猪脐带组织中的表达状况, 为猪脐带来源细胞的利用提供参考。**【方法】**以猪脐带为研究材料, 利用反转录聚合酶链反应(RT-PCR)和免疫组化方法, 分析干细胞“干性”调控关键基因 *Oct4*、*Nanog*、*Sox2*、*Rex1* 以及 SSEA-1、SSEA-3 和 SSEA-4 在猪脐带组织中的表达。**【结果】**RT-PCR 分析显示, 干细胞“干性”调控关键基因 *Oct4*、*Nanog*、*Sox2*、*Rex1* 在所有猪脐带样品中阳性转录, 但 *Nanog* mRNA 的相对表达量显著低于 *Oct4* mRNA、*Sox2* mRNA 和 *Rex1* mRNA, 而三者之间无显著差异; 免疫组化分析显示, *Oct4*、*Nanog*、*Sox2*、SSEA-1、SSEA-3 和 SSEA-4 在猪脐带组织中呈阳性染色, 表达这些蛋白抗原的阳性细胞主要分布于脐带华通氏胶, 且多集中于血管附近。**【结论】**从基因转录和蛋白水平证实猪脐带组织表达干细胞标志分子, SSEAs 表达谱与猪胚胎生殖细胞相符, 提示脐带组织中含有早期未分化的多潜能细胞。

[关键词] 猪; 脐带; 干细胞; “干性”调控关键基因; 胚胎阶段特异性抗原

[中图分类号] Q786; S828.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2014)05-0039-06

Expression of stem cell marker molecules in porcine umbilical cord

YU Shu-min¹, LING Zhan-ye^{1,2}, LIU Dan¹, LIU Huan-huan¹, XIA Juan¹,
SHEN Liu-hong¹, CAO Sui-zhong¹, ZUO Zhi-cai¹, DENG Jun-liang¹,
REN Zhi-hua¹, MA Xiao-ping¹, WANG Ya¹, HU Yan-chun¹

(1 Key Laboratory of Enviromental Hazard and Animal Disease for Sichuan Provincial Colleges,
College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014, China;

2 Henan Huangfanqu Xinxin Husbandry Co. Ltd, Zhoukou, Henan 466632, China)

Abstract: **【Objective】**The present study aimed to evaluate the expression of marker molecules of stem cells and stage-specific embryonic antigens (SSEAs) in porcine umbilical cord. **【Method】**Porcine umbilical cords were used as the material to analyze the expression of key regulatory genes including *Oct4*, *Nanog*, *Sox2*, and *Rex1* and SSEAs including SSEA-1, SSEA-3, and SSEA-4 by reverse transcribed polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunohistochemical staining. **【Result】**RT-PCR results demonstrated that all the genes were positively transcribed in all porcine umbilical cord samples and the relative expression of *Nanog* mRNA was significantly lower than those of *Oct4* mRNA, *Sox2* mRNA, and *Rex1* mRNA, which exhibited similar expression levels. Moreover, immunohistochemical staining showed that the proteins against antibodies of *Oct4*, *Nanog*, *Sox2*, SSEA-1, SSEA-3 and SSEA-4 exhibited positively in tissue sections of all umbilical cord samples, and the positive cells were mainly distributed in the Wharton's jelly adjacent

[收稿日期] 2013-09-13

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(31172379); 四川省学术与技术带头人培养基金项目

[作者简介] 余树民(1968—), 男, 四川汉源人, 副教授, 博士, 主要从事动物生殖生物学研究。E-mail: yayushumin@163.com

to umbilical tubes. 【Conclusion】 The study affirmed at the level of mRNA and protein that the marker molecules expressed in porcine umbilical cords and SSEAs patterns were consistent with porcine embryonic germ cells, hinting that porcine umbilical cord contained primitively undifferentiated stem cells.

Key words: porcine; umbilical cord; stem cells; “stemness” key regulatory genes; stage-specific embryonic antigens (SSEAs)

Oct4、Nanog、Sox2、Rex-1 是干细胞自我更新和多潜能性的关键调控因子^[1-2], 常与胚胎阶段特异性抗原 (Stage-specific embryonic antigen, SSEA) SSEA-1、SSEA-3 和 SSEA-4 一起被用作鉴定胚胎干细胞 (Embryonic stem cells, ES)^[3]、胚胎生殖细胞 (Embryonic germ cells, EG)^[4-5] 等多潜能细胞的标志分子。近年来, 有许多关于上述标志分子在不同组织器官来源的成体干细胞 (Somatic stem cells, SSCs) 中表达的研究报道, 如性腺^[6-7]、骨髓^[8-9]、脂肪^[8]、皮肤^[8]、血液^[10]、脐带^[11-16] 等, 因此许多学者将这些干细胞“干性”标志分子用于评价成体干细胞的多潜能性。脐带是妊娠时连接母体和胎儿的管状器官。近年来的研究表明。脐带是获取胎儿干细胞的最适来源之一, 利用脐带分离干细胞具有来源丰富、不需要手术取样和损伤小等优点, 且分离成功率可达 100%, 明显优于骨髓、脐血和脂肪^[17-18]; 脐带来源细胞增殖能力旺盛, 呈现碱性磷酸酶 (Alkaline phosphatase, ALP) 活性和高端粒酶活性, 表达早期胚胎细胞标志分子^[11-16, 18]。

猪不仅是一种与人类生活息息相关的重要经济动物, 而且是人类异种器官移植的理想来源。多潜能干细胞是猪基因改造和组织器官发育研究的重要起始材料。已有研究显示, 以分化程度低的干细胞作为细胞核移植供核细胞能显著提高重构胚囊的胚形成率^[19-20]。Carlin 等^[11] 报道, 猪脐带来源细胞具有碱性磷酸酶和端粒酶活性, 表达 Oct4、Nanog 和 Sox2, 体外培养可形成 ES 样细胞集落。基于此, 本试验以猪脐带为材料, 从基因转录和蛋白水平研究 SSEA-1、SSEA-3、SSEA-4、Oct4、Nanog、Sox2 和 Rex-1 的表达, 以期对猪脐带的利用及其来源细胞在转基因技术中更好地发挥作用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料 猪脐带采自四川某规模化猪场三元杂交 (长白×大白×杜洛克) 种猪足月分娩的仔猪, 共采集脐带 20 份; hES-18 细胞 RNA 由西北农林科技大学国家干细胞工程技术中心陕西分中心华

进联教授惠赠, 作为试验阳性对照; Hela 细胞由四川农业大学动物医学院动物生物技术中心保存, 作为试验阴性对照。

1.1.2 主要试剂 免疫组化用一抗为兔抗人 Nanog 和 Sox2 多克隆抗体, 以及鼠抗人 Oct4、SSEA-1、SSEA-3 和 SSEA-4 单克隆抗体等, 免疫组化用二抗为通用羊抗兔和羊抗鼠抗体, 以及显色试剂盒等, 均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。分子生物学实验用试剂焦碳酸二乙酯 (DEPC)、DNA Marker、RNA 保存液、总 RNA 抽提试剂盒 (Simple total RNA Kit) 和 PCR 2×Master Mix 等, 购自北京天根生化科技有限公司。PMD19-T Simple Vector、PrimeScript® RT reagent Kit 等, 购自大连宝生物工程有限公司。

1.1.3 引物设计与合成 以 GenBank 收录的基因 Oct4 (GenBank 登录号: DQ486513)、Nanog (GenBank 登录号: AY230262)、Sox-2 (GenBank 登录号: Z31560)、Rex-1 (GenBank 登录号: AF450454) 和 β actin (GenBank 登录号: DM_001101.3) 的 cDNA 序列为模板, 利用 Primer 5.0 软件设计引物, 引物序列和产物长度详见表 1。引物合成由上海生物工程有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 脐带组织总 RNA 的抽提 将猪脐带样品用无 RNA 酶磷酸盐缓冲液 (PBS) 反复漂洗去除血凝块与污物, 剪碎, 用 RNA 冻存液 -20℃ 保存备用。试验时, 按 RNA 抽提试剂盒说明书分别抽提脐带组织和 Hela 细胞 (阴性对照) 的总 RNA。

1.2.2 RT-PCR 检测分析和扩增片段测序 按照 PrimeScript® RT 试剂盒说明书分别将各样品总 RNA (包括 Hela 细胞) 及 hES-18 细胞 RNA (阳性对照) 反转录为 cDNA, 再取 cDNA 按下述反应条件在 PCR 仪 (型号 MyCycler, 美国 BIO-RAD) 上进行 PCR 反应, 检测各样品中基因 Oct4、Nanog、Sox2、Rex-1 和 β actin 的转录情况, 以 β actin 作为内参。PCR 反应体积均为 20 μ L, 包括 2×PCR Master Mix 10 μ L、样品 cDNA 2.0 μ L、上下游引物各 1.0 μ L 和双蒸水 6 μ L。PCR 反应条件为: 94℃ 预

变性 4 min;94 ℃变性 35 s,按表 1 所示温度退火 35 s,72 ℃延伸 40 s,35 个循环;最后 72 ℃延伸 10 min。反应完毕,扩增产物于 10 g/L 琼脂糖凝胶上电泳(90 mV,30 min),凝胶成像仪(型号 GelDoc 2000,美国 BIO-RAD)观察并记录电泳图像。试验重复 3 次。利用 Quantity One 软件将电泳图像中各目的条带的灰度值换算为具体数值,其与 β actin 电泳条带灰度值的比值即为目的基因在样品中的

mRNA 相对表达量,计算公式为:目的基因 mRNA 相对表达量=目的基因条带灰度值/ β actin 基因条带灰度值。

用 DNA 回收试剂盒分别回收脐带组织基因 *Oct4*、*Nanog*、*Sox2*、*Rex-1* 的 PCR 扩增片段,将其与测序载体 PMD19-T 连接,送华大基因有限责任公司测序。用 Blasta 软件将测序结果分别与相应基因的引物设计模板(见 1.1.3)进行同源比对。

表 1 检测基因的引物序列、退火温度和产物长度
Table 1 Primer sequences,annealing temperatures and fragment lengths of the tested genes

基因 Gene	引物序列 Sequence	退火温度/℃ T _m	产物长度/bp Product length
<i>Oct4</i>	F:5'-GCAGCGACTAT GCACAACGA-3' R:5'-GAGCCAGAGTGATGACGGA-3'	60	199
<i>Nanog</i>	F:5'-TATGCCTGTGATTTGTGGGC-3' R:5'-GTTTCTTGACCGGGACCTTG-3'	61	215
<i>Sox2</i>	F:5'- CCATGCACCGCTACGACG-3' R:5'-TGGGAGGAAGAGGTAACCACAG-3'	59	193
<i>Rex-1</i>	F:5'-GCTTGTCTCAGAGTGGATG-3' R:5'-CAGTATGAACCAAGAAATGTCTCT-3'	59	157
β actin	F:5'-CGGGAATCGTGCGTGAC-3' R:5'-TGGAAGGTGGACAGCGAGG-3'	60	443

1.2.3 脐带组织的免疫组化分析 将猪脐带样品浸入 40 mL/L 多聚甲醛溶液中固定,经常规冲洗、脱水、透明化、石蜡包埋、切片、烘片等程序制作组织切片,备用。部分切片经苏木精/伊红(HE)染色,观察组织形态结构,其中细胞核会被染成蓝色,胞浆染为红色。

免疫组化染色用于鉴定干细胞标志分子 *Oct4*、*Nanog*、*Sox2*、*SSEA-1*、*SSEA-3* 和 *SSEA-4* 蛋白抗原在脐带组织中的表达。*Oct4*、*Nanog* 和 *Sox2* 作为一抗进行免疫组化染色时,需对组织切片进行抗原修复,其余操作与 *SSEA-1*、*SSEA-3* 和 *SSEA-4* 作为一抗的试验操作相同,均按 SP 免疫组化试剂盒说明书进行操作,即将切片或经抗原修复的切片用双氧水处理,然后分别与一抗孵育,4 ℃过夜,清洗,再根据所用一抗加入羊抗兔或羊抗鼠二抗孵育,清洗后滴加显色试剂 DAB 显色,漂洗后脱水透明,于显微镜下观察照相,组织切片背景为微黄色或无色,反差强而能辨认即进行判定,切片中呈棕褐色、棕黄色、棕红色的为阳性细胞,说明该细胞表达一抗对应的蛋白抗原。其中,*Oct4*、*Nanog* 和 *Sox2* 为核蛋白抗原,*SSEA-1*、*SSEA-3* 和 *SSEA-4* 为胞浆或膜抗原,免疫组化染色切片未进行复染。

1.3 统计学分析

所得试验数据用“平均值±标准差($\bar{x}\pm SD$)”表

示,用 SPSS 13.0 软件进行方差分析, $P<0.05$ 表示差异显著, $P>0.05$ 表示差异不显著。

2 结果与分析

2.1 猪脐带组织中干细胞“干性”调控关键转录因子基因的 RT-PCR

RT-PCR 结果显示,从 20 份脐带样品中均扩增出干细胞“干性”调控关键基因 *Oct4*、*Nanog*、*Sox2* 和 *Rex1*(部分样品扩增结果见图 1)的目的条带;用同一引物和相同的 PCR 扩增条件也显示,阳性对照 hES-18 细胞强阳性表达基因 *Oct4*、*Nanog*、*Sox2* 和 *Rex1*,阴性对照 Hela 细胞不表达这 4 个基因(见图 1);将脐带组织基因 *Oct4*、*Nanog*、*Sox2* 和 *Rex1* 的 PCR 扩增片段分别回收并进行测序,显示各基因扩增片段序列与其模板(GenBank 登录号分别为 NR_002304、NM_024865、NM_003106 和 NM_174900)的同源性分别为 98%,99%,100%和 98%。该结果说明,本试验所用引物及反应条件特异扩增了各个目的基因,猪脐带组织转录表达干细胞“干性”调控关键基因 *Oct4*、*Nanog*、*Sox2* 和 *Rex1*。

由表 2 可知,*Nanog* mRNA 相对表达量显著低于 *Oct4* mRNA、*Sox2* mRNA 和 *Rex1* mRNA,而 *Oct4* mRNA、*Sox2* mRNA 和 *Rex1* mRNA 的相对表达量无显著性差异。

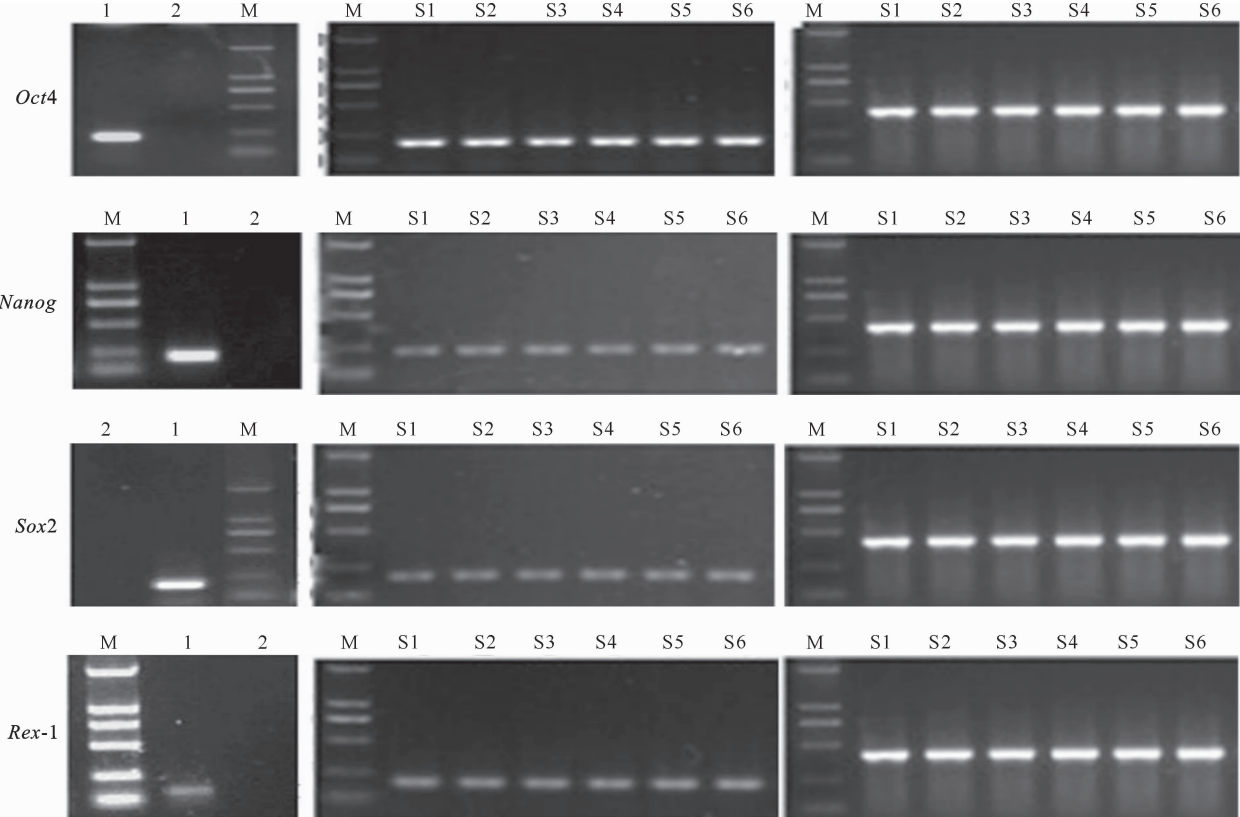


图 1 猪脐带部分样品中 *Oct4*、*Nanog*、*Sox2* 和 *Rex1* 基因表达的 RT-PCR 电泳结果
左图为阳性对照样品 hES-18(泳道 1)和阴性对照 Hela 细胞(泳道 2)的电泳结果;中图为检测目的基因的电泳结果;
右图为内参照基因 $\beta actin$ 的电泳结果; S1~S6 指所分析的 1—6 号样品;M. Marker DNA

Fig. 1 RT-PCR electrophoresis images for expression of *Oct4*, *Nanog*, *Sox2* and *Rex1* genes in partial samples of porcine umbilical cords

Left figures show RT-PCR electrophoresis images for expression of the tested genes in controls hES-18 cells (Lane 1) and Hela cells (Lane 2), and middle figures show that of the tested genes and right figures show that of $\beta actin$ (the inner control) in the sample of porcine umbilical cords marked by S1, S2, S3, S4, S5 and S6, respectively; M. Marker DNA

表 2 猪脐带组织中基因 *Oct4*、*Nanog*、*Sox2* 和 *Rex1* mRNA 的相对表达量

Table 2 Relative expression of *Oct4*, *Nanog*, *Sox2* and *Rex1* mRNA in porcine umbilical cords

基因 Gene	mRNA 相对表达量 Relative expression	基因 Gene	mRNA 相对表达量 Relative expression
<i>Oct4</i>	1. 209 9±0. 100 2 a	<i>Rex1</i>	1. 352 2±0. 049 9 a
<i>Nanog</i>	0. 815 4±0. 058 7 b	<i>Sox2</i>	1. 499 2±0. 053 1 a

注:同列数据后标相同字母表示无显著性差异($P>0.05$),标不同字母表示差异显著($P<0.05$)。
Note: Same letters in each row indicate no significant difference ($P>0.05$), while different letters indicate significant difference ($P<0.05$).

2.2 猪脐带组织中胚胎干细胞标志分子表达的免疫组化分析

以 *Oct4*、*Nanog*、*Sox2*、SSEA-1、SSEA-3 和 SSEA-4 为一抗的免疫组化分析结果如图 2 所示,试验脐带样品的统计结果见表 3。由图 2 和表 3 可知,75% 以上猪脐带样品阳性表达 *Oct4*、*Nanog*、*Sox2*、SSEA-1、SSEA-3 和 SSEA-4 蛋白抗原,阳性细胞不同程度地被染成棕褐色、棕红色或棕黄色;*Nanog* 呈阳性染色的样品数量明显较 *Oct4*、*Sox2*、

SSEA-1 多,但在组织切片上其着色强度明显较后三者弱,而 *Sox2*、SSEA-1 的着色程度明显强于 *Oct4*、*Nanog*、SSEA-3 和 SSEA-4。图 2 还显示,阳性细胞主要分布于临近血管的华通氏胶区域,细胞多为椭圆形和圆形,多数单个散在,也有少数成簇聚集。组织切片 H/E 染色结果(图 2)显示,血管周围及华通氏胶区域分布较多单个散在的小细胞,这类细胞呈苏木精深染。

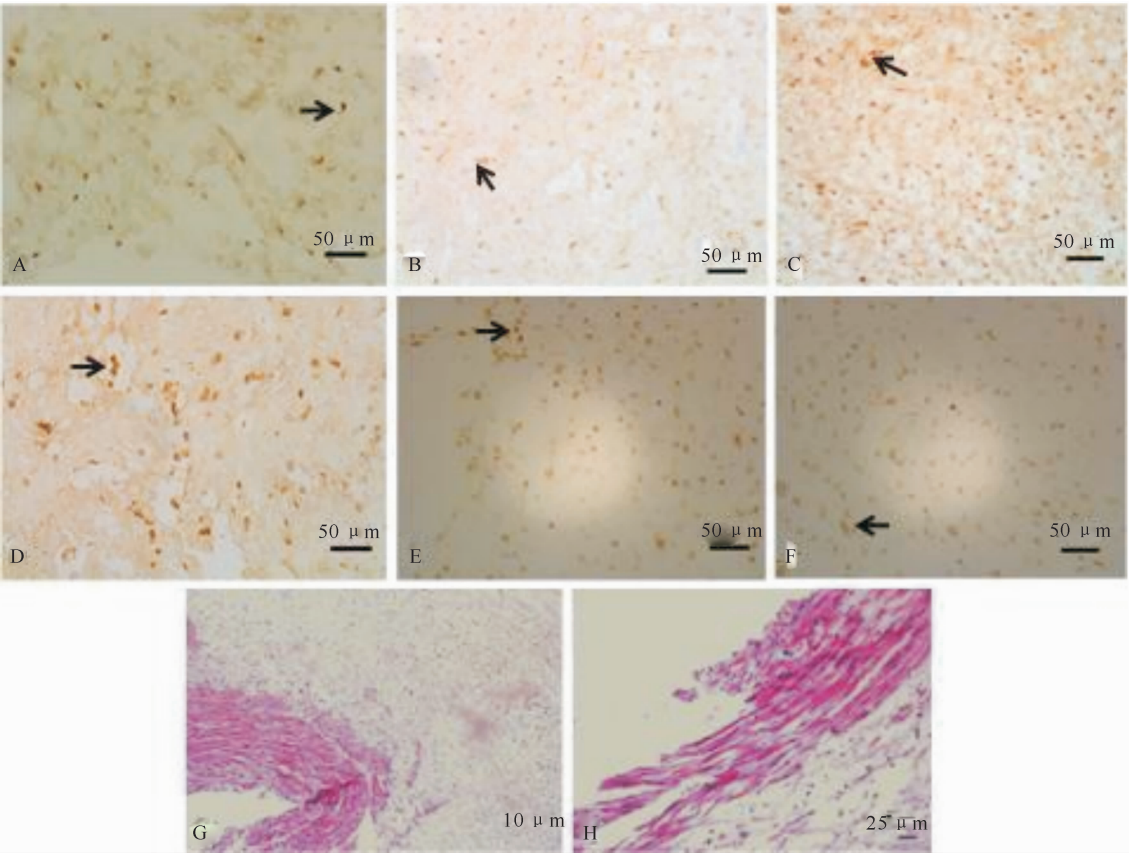


图 2 猪脐带组织 HE 染色及其免疫组化分析
A~F. Oct4、Nanog、Sox2、SSEA-1、SSEA-3 和 SSEA-4 为一抗的免疫组化染色观察，
箭头所指分别为目的一抗的阳性着色细胞；G、H. HE 染色

Fig. 2 H/E and Immunohistochemical staining of tissue sections for porcine umbilical cords
A~F. The immunohistochemical staining results for the first antibodies against Oct4、Nanog、Sox2、SSEA-1、SSEA-3 and
SSEA-4, respectively, the arrows show the positively stained cells against the first antibodies; G, H. Stained by hematoxylin and eosin

表 3 多潜能细胞标志分子在猪脐带组织中表达的免疫组化检测(n=20)
Table 3 Immunohistochemical analysis of pluripotent cells marker molecules expressed in
porcine umbilical cord samples (n=20)

标志分子 Marker molecules	阳性率/% Positive ratio	标志分子 Marker molecules	阳性率/% Positive ratio
Oct4	85(17/20)	SSEA-1	75(15/20)
Nanog	90(18/20)	SSEA-3	85(17/20)
Sox2	80(16/20)	SSEA-4	75(15/20)

3 讨 论

尽管有报道指出,脐带源原代细胞能形成 ES 样细胞集落,但传代后均呈纤维样细胞形态^[12-13]。而目前从脐带分离的主要是间充质干细胞(Mesenchymal stem cells, MSC),虽已有一些关于脐带来源细胞表达 ES 细胞标志分子的研究报道,但其结果并不完全一致。在人上,Jo 等^[12]和 Fong 等^[13-14]分别报道脐带源 MSC 表达 *Oct4*、*Nanog*、*Sox2*、*SSEA-4*、*Tra-1-60* 和 *Tra-1-81*,但关于 *SSEA-1*、

SSEA-3 表达的结果却不尽一致;Carlin 等^[11]、Lee 等^[16]分别报道猪和犬的脐带基质细胞表达 *Nanog*、*Oct4*、*Sox2*,其中犬脐带基质细胞还表达 *SSEA-4*。Hoynowski 等^[15]报道,马脐带基质细胞表达 *Oct4*、*SSEA-3*、*SSEA-4*、*Tra-1-60*、*c-Kit*、*CD133* 和 *C-myc*。综观以上研究,其均以体外培养的细胞为材料,而不同培养条件会使基因表达呈现不同的特点^[21-22],所以体外培养的细胞不一定能真实反映脐带组织的基因表达状况。本试验中,RT-PCR 和免疫组化分析结果显示,猪脐带组织在基因转录和蛋

白质水平均表达 Oct4、Nanog、Sox2,同时也转录表达 *Rex-1* mRNA,结果与 Carlin 等^[11]、Jo 等^[12]、Fong 等^[13-14] 和 Lee 等^[16] 的结果一致;免疫组化分析结果还显示,猪脐带组织表达 SSEA-1、SSEA-3 和 SSEA-4 抗原,与 Jo 等^[12]、Fong 等^[13-14]、Hoynowski 等^[15] 以及 Lee 等^[16] 的结果部分一致,SSEA 表达特点与 Tsung 等^[23] 报道的猪胚胎生殖细胞一致,提示脐带可能存留有未分化原始生殖细胞。本试验中,猪脐带组织切片的 H/E 染色结果显示,临近血管的华通氏胶区域分布有较多体积小且以胞核着色为主的细胞,但目前还未见从脐带获得类 ES 细胞或 EG 细胞的报道;另外,脐带来源 MSC 所表现的早期未分化干细胞特点是其本身所为,还是因为其中含有多潜能性早期胚胎细胞,或者含有最近报道的极小胚胎样干细胞(Very small embryonic-like cells, VSEL)^[24],尚需要进一步研究。

有研究指出,Oct4 并不是 SSCs 自我更新和多潜能性维持所必需的转录因子^[9,25],Nanog 是人 MSC 多潜能调控因子^[9]。Arnold 等^[26] 指出,Sox2 是早期胚胎、胎儿和出生后个体等不同发育阶段各类型干细胞或未成熟前体细胞共同表达的标志分子,是机体各种干细胞/前体细胞自我更新和保持分化潜能所必需的内源性转录因子。本试验结果显示,不管是基因转录水平还是蛋白水平,Sox-2 均呈现高表达,根据 Arnold 等^[26] 的结果推断,这可能与脐带再生有关;另外,笔者注意到 *Oct4* mRNA 表达量与 *Sox-2* mRNA 差异不显著,但免疫组化分析结果显示其呈弱表达,这一差异可能与部分 *Oct4* mRNA 无翻译功能有关,或者是 *Oct4* 表达假基因的结果,因为有报道指出,在很多情况下 *Oct4* 存在假基因表达的现象^[27]。

本研究在 mRNA 转录和蛋白水平上证实,多潜能性细胞标志分子 Oct4、Nanog、Sox2、SSEA-1、SSEA-3 和 SSEA-4 在猪脐带组织中表达,SSEA 表达特点与猪胚胎生殖细胞一致,提示猪脐带组织中可能含有早期未分化的多潜能细胞。

[参考文献]

- [1] Boyer L A, Lee T I, Cole M F, et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells [J]. *Cell*, 2005, 122(6): 947-956.
- [2] Boiani M, Schöler H R. Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6(11): 872-884.
- [3] Ginis I, Luo Y, Miura T, et al. Differences between human and mouse embryonic stem cells [J]. *Dev Biol*, 2004, 269(2): 360-380.
- [4] Shambloott M J, Axelman J, Wang S, et al. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1998, 95(23): 13726-13731.
- [5] Leitch H G, Blair K, Mansfield W, et al. Embryonic germ cells from mice and rats exhibit properties consistent with a generic pluripotent ground state [J]. *Development*, 2010, 137(14): 2279-2287.
- [6] Conrad S, Renninger M, Hennenlotter J, et al. Generation of pluripotent stem cells from adult human testis [J]. *Nature*, 2008, 456(7220): 344-349.
- [7] Parte S, Bhartiya D, Telang J, et al. Detection, characterization, and spontaneous differentiation *in vitro* of very small embryonic-like putative stem cells in adult mammalian ovary [J]. *Stem Cells Dev*, 2011, 20(8): 1451-1464.
- [8] Riekstina U, Cakstina I, Parfejevs V, et al. Embryonic stem cell marker expression pattern in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, heart and dermis [J]. *Stem Cell Rev*, 2009, 5(4): 378-386.
- [9] Pierantozzi E, Gava B, Manini I, et al. Pluripotency regulators in human mesenchymal stem cells: Expression of NANOG but not of OCT-4 and SOX-2 [J]. *Stem Cells Dev*, 2011, 20(5): 915-923.
- [10] Cesselli D, Beltrami A P, Rigo S, et al. Multipotent progenitor cells are present in human peripheral blood [J]. *Circ Res*, 2009, 104(10): 1225-1234.
- [11] Carlin R, Davis D, Weiss M, et al. Expression of early transcription factors Oct-4, Sox-2 and Nanog by porcine umbilical cord (PUC) matrix cells [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2006, 4: 5-13.
- [12] Jo C H, Kim O S, Park E Y, et al. Fetal mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord sustain primitive characteristics during extensive expansion [J]. *Cell Tissue Res*, 2008, 334(3): 423-433.
- [13] Fong C Y, Richards M, Manasi N, et al. Comparative growth behaviour and characterization of stem cells from human Wharton's jelly [J]. *Reprod Biomed Online*, 2007, 15(6): 708-718.
- [14] Fong C Y, Chak L L, Biswas A, et al. Human Wharton's jelly stem cells have unique transcriptome profiles compared to human embryonic stem cells and other mesenchymal stem cells [J]. *Stem Cell and Rep*, 2011, 7: 1-16.
- [15] Hoynowski S M, Fry M M, Gardner B M, et al. Characterization and differentiation of equine umbilical cord-derived matrix cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 362(2): 347-353.
- [16] Lee K S, Nah J J, Lee B C, et al. Maintenance and characterization of multipotent mesenchymal stem cells isolated from canine umbilical cord matrix by collagenase digestion [J]. *Res Vet Sci*, 2013, 94(1): 144-151.

- in *Vaccinium corymbosum* (Ericaceae) [J]. American Journal of Botany, 2008, 95(12): 1506-1514.
- [20] Goebel M, Hobbie S E, Bulaj B, et al. Decomposition of the finest root branching orders: Linking belowground dynamics to fine-root function and structure [J]. Ecological Monographs, 2011, 81(1): 89-102.
- [21] Wells C E, Eissenstat D M. Marked differences in survivorship among apple roots of different diameters [J]. Ecology, 2001, 82(3): 882-892.
- [22] Wang Z, Guo D, Wang X, et al. Fine root architecture, morphology, and biomass of different branch orders of two Chinese temperate tree species [J]. Plant and Soil, 2006, 288(1/2): 155-171.
- [23] Guo D L, Mitchell R J, Hendricks J J. Fine root branch orders respond differentially to carbon source-sink manipulations in a longleaf pine forest [J]. Oecologia, 2004, 140(3): 450-457.
- [24] Huang G, Zhao X, Zhao H, et al. Linking root morphology, longevity and function to root branch order: A case study in three shrubs [J]. Plant and Soil, 2010, 336(1/2): 197-208.
- [25] Makita N, Hirano Y, Dannoura M, et al. Fine root morphological traits determine variation in root respiration of *Quercus serrate* [J]. Tree Physiology, 2009, 29(4): 579-585.
- [26] Eissenstat D M, Yanai R D. The ecology of root lifespan [J]. Advances in Ecological Research, 1997, 27: 1-60.
- [27] 郭秀珍, 毕国昌. 林木菌根及应用技术 [M]. 北京: 中国林业出版社, 1989.
- Guo X Z, Bi G C. Tree mycorrhizae and application technology [M]. Beijing: China Forestry Publishing House, 1989. (in Chinese)
- [28] Cahill J F, Menickel G G, Haag J J, et al. Plants integrate information about nutrients and neighbors [J]. Science, 2010, 328(5986): 1657.
- [29] 许 畅, 谷加存, 董雪云, 等. 海南岛 4 个热带阔叶树种前 5 级细根的形态、解剖结构和组织碳氮含量 [J]. 植物生态学报, 2011, 35(9): 955-964.
- Xu Y, Gu J C, Dong X Y, et al. Fine root morphology, anatomy and tissue nitrogen and carbon contents of the first five orders in four tropical hardwood species in Hainan Island, China [J]. Chinese Journal of Plant Ecology, 2011, 35(9): 955-964. (in Chinese)
- [30] 常文静, 郭大立. 中国温带、亚热带和热带森林 45 个常见树种细根直径变异 [J]. 植物生态学报, 2008, 32(6): 1248-1257.
- Chang W J, Guo D L. Variation in root diameter among 45 common tree species in temperate, subtropical and tropical forests in China [J]. Journal of Plant Ecology, 2008, 32(6): 1248-1257. (in Chinese)
- [31] 刘永俊. 丛枝菌根的生理生态功能 [J]. 西北民族大学学报: 自然科学版, 2008(1): 54-59.
- Liu Y J. The physiological and ecological functions of arbuscular mycorrhizal [J]. Journal of Northwest University for Nationalities: Natural Science Edition, 2008(1): 54-59. (in Chinese)

(上接第 44 页)

- [17] Secco M, Zucconi E, Vieira N M, et al. Multipotent stem cells from umbilical cord: Cord is richer than blood [J]. Stem Cells, 2008, 26: 146-150.
- [18] Troyer D L, Weiss M L. Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population [J]. Stem Cells, 2008, 26(3): 591-599.
- [19] Zhu H, Craig J A, Dyce P W, et al. Embryos derived from porcine skin-derived stem cells exhibit enhanced preimplantation development [J]. Biol Reprod, 2004, 71: 1890-1897.
- [20] Bosch P, Pratt S L, Stice S L. Isolation, characterization, gene modification and nuclear transfer reprogramming of porcine mesenchymal stem cells [J]. Biol Reprod, 2006, 74: 46-57.
- [21] Kues W A, Petersen B, Mysegades W, et al. Isolation of murine and porcine fetal stem cells from somatic tissue [J]. Biol Reprod, 2005, 72(4): 1020-1028.
- [22] Pochampally R R, Smith J R, Ylostalo J, et al. Serum deprivation of human marrow stromal cells (hMSCs) selects for a subpopulation of early progenitor cells with enhanced expression of OCT-4 and other embryonic genes [J]. Blood, 2004, 103(5): 1647-1652.
- [23] Tsung H C, Du Z W, Rui R, et al. The culture and establishment of embryonic germ (EG) cell lines from Chinese mini swine [J]. Cell Res, 2003, 13(3): 195-202.
- [24] Kucia M, Halasa M, Wyszmyrski M, et al. Morphological and molecular characterization of novel population of CXCR4⁺, SSEA4⁺, Oct4⁺ very small embryonic-like cells purified from human cord blood: Preliminary report [J]. Leukemia, 2007, 21(2): 297-303.
- [25] Lengner C J, Camargo F D, Hochedlinger K, et al. Oct4 expression is not required for mouse somatic stem cell self-renewal [J]. Cell Stem Cell, 2007, 1(4): 403-415.
- [26] Arnold K, Sarkar A, Yram M A, et al. Sox2(+) adult stem and progenitor cells are important for tissue regeneration and survival of mice [J]. Cell Stem Cell, 2011, 9(4): 317-329.
- [27] Suo G, Han J, Wang X, et al. Oct4 pseudogenes are transcribed in cancers [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 337(4): 1047-1051.