

α -硫辛酸增强人脐带间充质干细胞免疫抑制作用的实验研究

章杰 姚欢 吴梦云 李娅莎 杨珂*

(重庆医科大学附属儿童医院儿科研究所, 儿童发育疾病研究教育部重点实验室, 儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地, 儿科学重庆市重点实验室, 重庆市干细胞治疗工程技术研究中心, 重庆 400014)

摘要 核因子NF-E2相关因子2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, NRF2)是细胞抗氧化应激的关键分子, 激活NRF2可以有效逆转干细胞的衰老表型。该文主要研究NRF2激动剂 α -硫辛酸(α -lipoic acid, ALA), 增强脐带间充质干细胞(umbilical cord mesenchymal stem cells, UC-MSCs)免疫抑制能力。培养第5代和第18代的UC-MSCs, 通过 β -gal染色、CCK-8及免疫荧光检测细胞增殖能力和衰老表型。Western blot检测衰老相关蛋白p16以及NRF2信号通路相关分子NRF2、Ser40磷酸化的NRF2(pS40-NRF2)蛋白表达。qRT-PCR检测细胞免疫调节抑制因子吲哚胺-2,3-双加氧酶1(indoleamine 2,3-dioxygenase 1, *IDO-1*) mRNA表达水平的差异, 流式细胞术检测UC-MSCs抑制外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)增殖能力的差异。结果显示, UC-MSCs在体外长期扩增过程中增殖能力降低并表现出衰老表型; Western blot检测NRF2及pS40-NRF2蛋白表达降低; IFN- γ 依赖的*IDO-1*的mRNA表达水平显著降低, 抑制PBMC增殖能力下降。ALA作用后 β -gal染色阳性细胞数量减少并促进细胞增殖; *IDO-1*的mRNA表达增加以及抑制PBMC增殖的能力增强。该研究结果提示, ALA可以延缓UC-MSCs的衰老, 并增强其免疫抑制能力。

关键词 α -硫辛酸; 脐带间充质干细胞; NRF2; 细胞复制性衰老; 免疫抑制

Effect of α -lipoic Acid on Immunosuppressive Effect of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells

Zhang Jie, Yao Huan, Wu Mengyun, Li Yasha, Yang Ke*

(Pediatric Research Institute, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders, National International Science and Technology Cooperation Base for Major Children's Development, Chongqing Key Laboratory of Pediatrics, Chongqing Stem Cell Therapy Engineering Research Center, Chongqing 400014, China)

Abstract Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2) is a key molecule of antioxidative stress in cells. Activation of NRF2 could effectively reverse the senescence phenotype of stem cells. The purpose of the study was to investigate the role of α -lipoic acid (ALA), an agonist of NRF2, in promoting immunosuppression ability of umbilical cord mesenchymal stem cells (UC-MSCs). P5 and P18 UC-MSCs were cultured, cell proliferation and senescence phenotype were detected by β -gal staining, CCK-8 and immunofluorescence. Western blot was used to detect the expression of senescence-associated protein p16 and NRF2 signaling pathway-related molecules NRF2 and pS40-NRF2. Real-time quantitative PCR was used to detect the difference of mRNA expression of in-

收稿日期: 2018-12-24

接受日期: 2019-03-01

重庆市自然科学基金(批准号: cstc2017jcyjAX0171、cstc2014jcyjA10090)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13983774210, E-mail: 361885986@qq.com

Received: December 24, 2018

Accepted: March 1, 2019

This work was supported by the National Natural Science Foundation of Chongqing (Grant No.cstc2017jcyjAX0171, cstc2014jcyjA10090)

*Corresponding author. Tel: +86-13983774210, E-mail: 361885986@qq.com

网络出版时间: 2019-06-14 14:19:56

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190614.1419.004.html>

doleamine 2,3-dioxygenase 1 (*IDO-1*), which is the cellular immunomodulatory inhibitory factor. Flow cytometry was used to detect the difference in the ability of UC-MSCs to inhibit peripheral blood mononuclear cell (PBMC) proliferation. The results showed that after long-term amplification *in vitro*, UC-MSCs showed senescence phenotype and their proliferative ability decreased; the protein expression of NRF2 and pS40-NRF2 was decreased; the mRNA expression level of IFN- γ -resistant *IDO-1* was decreased significantly, and their ability of inhibiting PBMC proliferation was decreased. After UC-MSCs treated by ALA, the number of β -gal staining positive cells was decreased and cell proliferation was promoted. The expression of *IDO-1* was increased and the ability of inhibiting PBMC proliferation was promoted. We concluded that ALA can delay the aging of UC-MSCs and enhance UC-MSCs immunosuppressive ability.

Keywords α -lipoic acid; umbilical cord mesenchymal stem cells; NRF2; cell replicative senescence; immunosuppression

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是具有高度自我更新和多向分化潜能的多能干细胞,具有来源广泛、免疫原性低、造血支持和免疫调节等生物学特性,在组织损伤、免疫调控和再生医学等领域受到广泛的关注^[1]。MSCs在急性移植物抗宿主病(graft versus-host disease, GVHD)及自身免疫性相关疾病的治疗中显示出良好的临床效果,源于其特殊的免疫调节作用^[2]。

脐带间充质干细胞(umbilical cord mesenchymal stem cells, UC-MSCs)取材方便,无道德伦理争议,尤其具有免疫调节作用,同时没有配型、排异等特性,UC-MSCs这些特性使其成为MSCs移植治疗免疫相关疾病的理想来源。虽然早期的临床研究显示了MSCs的安全性,但临床有效性受到争议。因此,探究影响MSCs免疫调节活性的因素是发展其有效治疗策略的关键^[3]。体外大量扩增是MSCs在临床应用中必经的一个过程,伴随的复制性衰老可能是影响MSCs临床应用有效性的重要原因之一。研究发现, MSCs复制性衰老导致其成骨分化能力下降。与早期代数的MSCs相比,晚期代数的细胞显示出较低的免疫调节能力^[4],因此减缓MSCs的衰老可能有利于其免疫抑制能力发挥。

核因子NF-E2相关因子2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, NRF2)是进化上保守的转录因子,与抗氧化反应元件(antioxidant responsive element, ARE)相互作用调节编码抗氧化蛋白, NRF2/ARE是机体自身防御的重要机制,起到减少细胞凋亡、参与神经保护、延缓衰老和减少器官损伤等多方面的作用^[5-6]。研究发现, NRF2介导的细胞抗氧化通路的紊乱是导致细胞衰老的重要驱动力之一,激活NRF2

可以延缓间充质干细胞衰老的进程^[7]。但NRF2是否参与UC-MSCs免疫抑制调节能力,目前尚无具体的报道。本实验将探讨激活NRF2的抗衰老能力在调节UC-MSCs免疫抑制能力中的潜在作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

人脐带间充质干细胞(UC-MSCs)来源于重庆市干细胞治疗工程技术研究中心。DMEM/F-12(1:1)培养基、RPMI-1640培养基、胎牛血清均购自Gibco公司; α -硫辛酸注射液(ALA)购自重庆药友制药有限责任公司; CCK8试剂盒购自日本同仁化学研究所; 细胞衰老 β -半乳糖苷酶染色试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; 高纯度总RNA快速提取试剂盒购自北京百泰克生物技术公司; 逆转录试剂盒购自Thermo公司; RealMaster Mix购自北京天根生化科技有限公司; p16抗体购自proteintech公司; HP-1 γ 抗体购自santa Cruz公司; NRF2和pS40-NRF2抗体购自Abcam公司。

1.2 方法

1.2.1 配置普通培养基、PBMC培养基 含10%胎牛血清的DMEM/F-12培养基作为普通培养基; 含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基作为PBMC培养基。

1.2.2 实验设计分组 培养同一个体来源的UC-MSCs第5代(P5)和第18代(P18)UC-MSCs, 浓度100 μ mol/L的ALA处理UC-MSCs为ALA组, 等量PBS液作为对照组。

1.2.3 CCK-8细胞增殖检测 在96孔板中铺30%的细胞, 在培养箱预培养8 h, 待细胞贴壁后, 加入0.01 μ mol ALA (浓度100 μ mol/L), PBS作为对照。细胞培养箱孵育2天, 每孔加入10 μ L的CCK-8溶液, 将培养板在培养

箱内孵育2.5 h,用酶标仪测定在450 nm处的吸光度。

1.2.4 β -半乳糖苷酶(β -gal)染色 不同代数细胞或ALA处理细胞3天,配置一定体积的 β -gal染色液(每孔500 μ L),按照一定浓度配置染色工作液,比例为 β -gal染色液A液:B液:C液:X-gal溶液=10:10:930:50。UC-MSCs用PBS洗涤1次,加入500 μ L的 β -gal固定液,室温固定15 min, PBS洗3 min \times 3次,加入染色工作液,37 $^{\circ}$ C无CO₂孵箱过夜,加入少量PBS,相差显微镜下采集图片。

1.2.5 实时荧光定量PCR TRizol充分裂解细胞,提取实验组和对照组的细胞总mRNA,利用随机引物反转录为cDNA, ddH₂O 4.5 μ L、2.5 \times RealMaster Mix 7.5 μ L、cDNA 2 μ L及引物1 μ L,所得数据通过2^{- $\Delta\Delta$ Ct}方法来计算,引物序列为(F: 5'-GCC AGC TTC GAG AAA GAG TTG-3', R: 5'-ATC CCA GAA CTA GAC GTG CAA-3')。 *β -actin*作为内参基因分别检测目的基因的相对表达,每个基因检测设置3个重复。用Bio-Rad CFX Manager仪器进行检测。

1.2.6 Western blot检测 PBS洗涤细胞2次,每孔加入上样缓冲液与电泳液SDS-PAGE 1:4的溶液1 mL,尽量刮干净细胞,沸水煮蛋白15 min,使蛋白完全变性,每组取20 μ L蛋白上样,电泳后根据蛋白分子量选择合适的切胶范围以及转膜时间,电转时根据胶的大小裁好同样大小的PVDF膜,精准对齐,半干转膜。转膜完毕后TBST洗3 min \times 5次;5%的脱脂奶粉常温封闭1 h,加入一抗(1:2 500稀释液),4 $^{\circ}$ C放置10~12 h, TBST洗3 min \times 5次,再加入相应的二抗,常温孵育1 h后TBST洗3 min \times 5次,显色液显色。

1.2.7 免疫荧光染色 对第5代和第18代的细胞爬片进行4%多聚甲醛固定15 min,0.5%的Triton X-100室温通透20 min,山羊血清室温封闭30 min,加入一抗HP-1 γ 稀释液4 $^{\circ}$ C孵育过夜,第2天PBS洗涤3 min \times 3次,荧光二抗稀释液室温孵育1 h,从加入荧光二抗起,后面所有操作步骤都避光处进行;4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)染液复染细胞核5 min, PBS洗涤3 min \times 3次,吸干爬片液体,用抗荧光淬灭封片液封片,荧光显微镜下观察采集图像。

1.2.8 PBMC分离培养 取外周血10 mL,等体积PBS稀释后,沿管壁缓缓加入到预先装有10 mL的Ficoll分离液的离心管中,600 \times g离心力离心20 min。吸取中间白膜层, PBS洗涤2次。用10 μ g/mL的植物血凝素(phytohaemagglutinin, PHA)刺激活化。

1.2.9 PBMC增殖实验 24孔板预先接种UC-MSCs, PBMC预先用羧基荧光素二醋酸琥珀酰亚胺酯(5,6-carboxyfluorescein diacetate, succinimidy ester, CFSE)标记,与UC-MSCs按照5:1比例接种。共培养3天后,以单独培养的CFSE标记的PBMC为对照。流式细胞术检测PBMC的增殖率。

1.2.10 统计学方法 本实验统计学分析采用SPSS 17.0进行,组间样本比较采用非配对 t 检验,数据均以mean \pm SEM表示, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。每组实验均重复3次。

2 结果

2.1 UC-MSCs体外长期扩增中伴随细胞增殖能力的降低和衰老表型

收集第5代和第18代的UC-MSCs,进行 β -gal染色,与P5代数相比较,P18代数的UC-MSCs中衰老相关的 β -gal染色阳性细胞明显增加(图1A);CCK-8检测结果显示,较P5代数细胞相比,P18代数的UC-MSCs增殖能力明显下降,尤其是对数生长期(4~7天),差异具有统计学意义($P<0.05$)(图1B);免疫荧光染色显示P18代数的UC-MSCs细胞核中异染色质蛋白1 γ (HP-1 γ)表达明显增加,并且呈现点状分布(图1C)。

2.2 UC-MSCs体外长期扩增中伴随NRF2/ARE通路相关蛋白表达降低

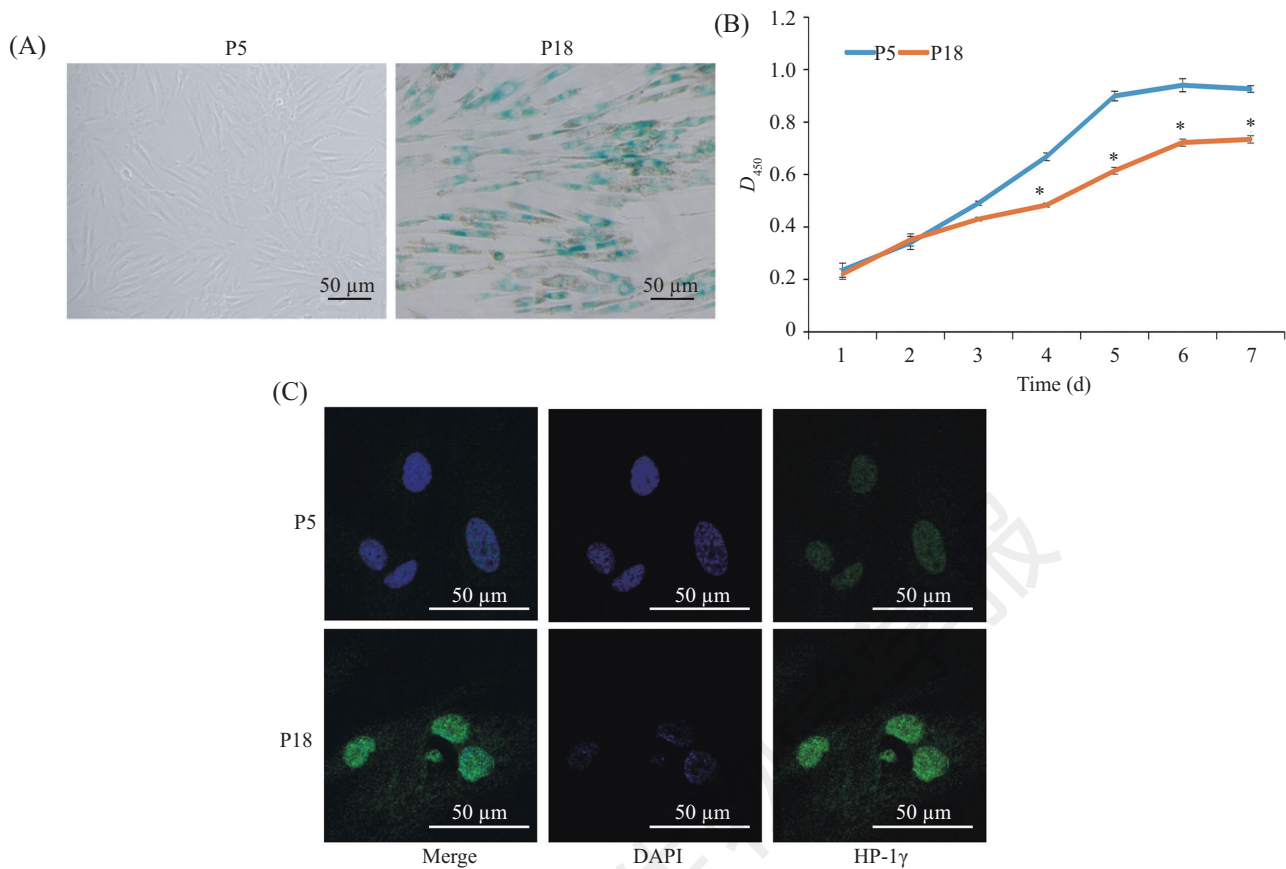
Western blot检测P5代数和P18代数UC-MSCs,衰老相关蛋白p16和NRF2/ARE通路相关蛋白NRF2、pS40-NRF2表达差异。结果显示,与P5代数细胞比较,P18代数中p16蛋白表达量增加为194.80%,NRF2和pS40-NRF2蛋白表达量降低为40.54%和40.90% ($P<0.001$)(图2B)。以上提示,随着细胞传代的增加,NRF2及pS40-NRF2的表达降低。

2.3 UC-MSCs体外长期扩增中IFN- γ 依赖的IDO-1表达降低

用不同浓度的干扰素 γ (IFN- γ)分别处理第5代和第18代的UC-MSCs,3天后qRT-PCR检测显示,与早期代数UC-MSCs比较,晚期代数细胞的免疫调节抑制因子IDO-1表达显著降低($P<0.05$)(图3)。

2.4 UC-MSCs体外长期扩增中伴随免疫抑制能力的降低

PBMC增殖实验共培养3天后,CFSE标记法检测PBMC的增殖能力。PHA刺激后,PBMC的增殖明显,增殖比例为100%。在该体系中加入相等数量的

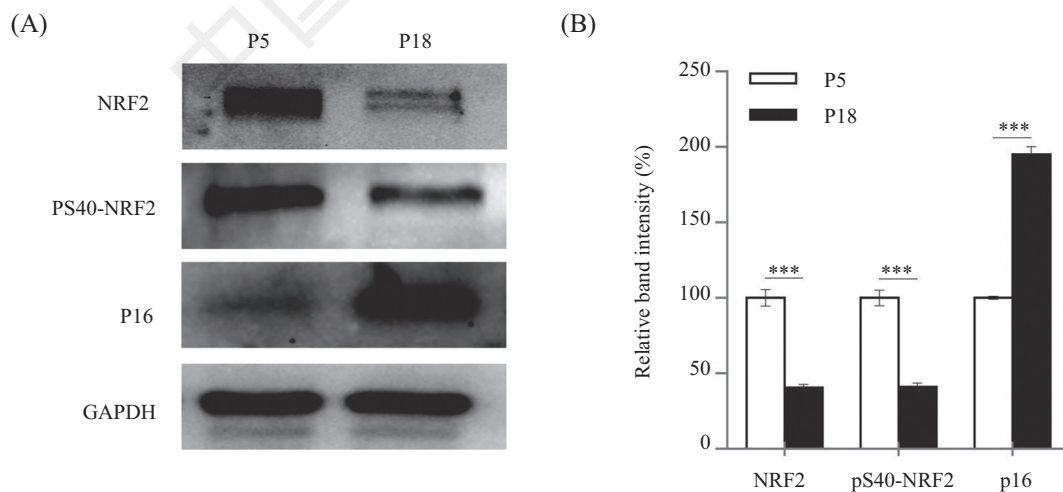


A: β -gal染色法检测第5代和第18代UC-MSCs β -半乳糖苷酶活性; B: 第5代和第18代UC-MSCs的细胞生长曲线, $*P < 0.05$, 与P5组比较; C: 第5代和第18代UC-MSCs HP-1 γ 的免疫荧光染色。

A: β -gal staining of UC-MSCs at passage 5 and passage 18; B: cell growth curve of UC-MSCs at passage 5 and passage 18, $*P < 0.05$ vs P5 group; C: HP-1 γ immunofluorescence detection of UC-MSCs at passage 5 and passage 18.

图1 早期和晚期代数UC-MSCs增殖和衰老特性

Fig.1 Cell proliferation and senescence of early and late passage UC-MSCs

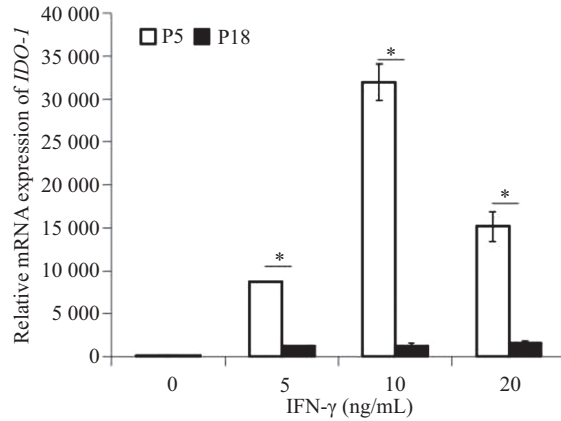


A: Western blot检测早期和晚期代数UC-MSCs的NRF2蛋白表达的变化情况; B: 相对灰度值分析, $***P < 0.001$ 。

A: Western blot analysis of protein expression changes associated with NRF2 in early and late passage UC-MSCs; B: corresponding gray value analysis, $***P < 0.001$.

图2 早期和晚期代数UC-MSCs的NRF2蛋白水平的表达

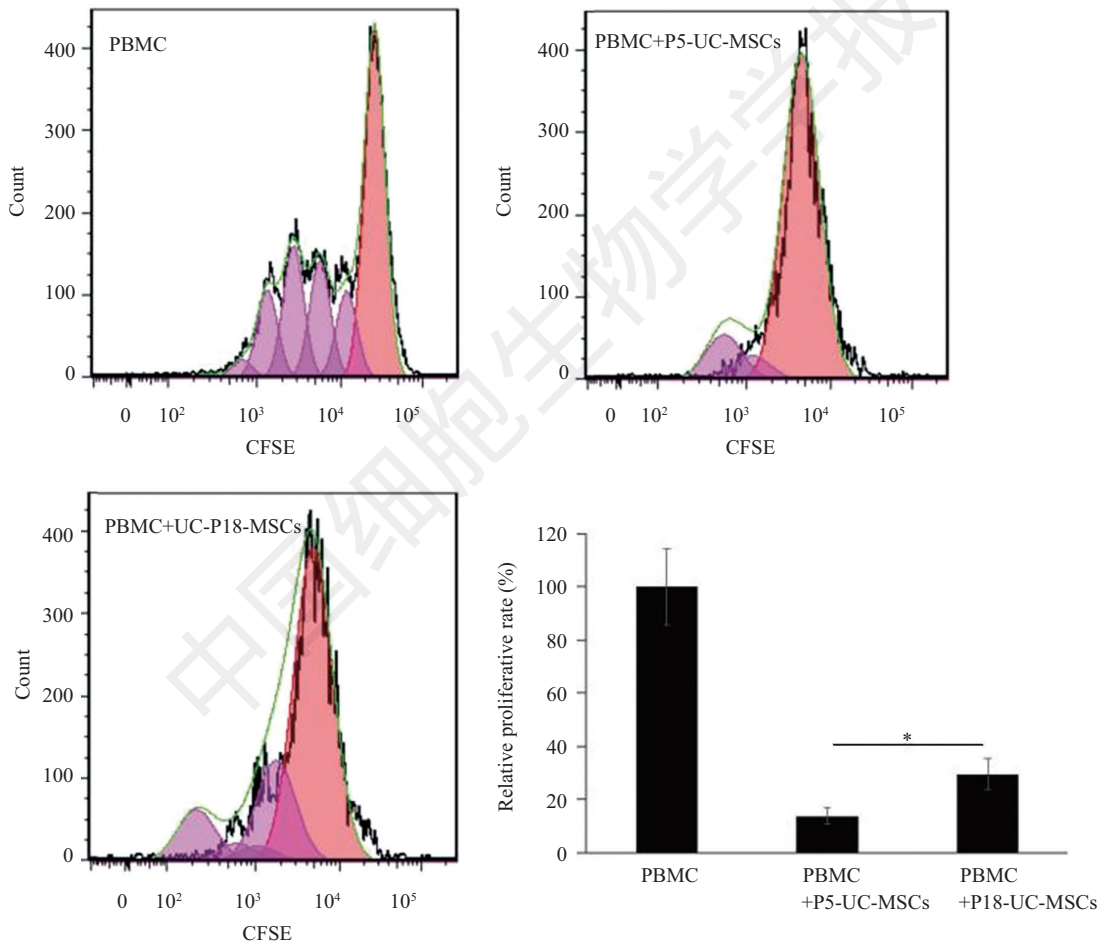
Fig.2 The protein expression level of NRF2 in early and late passage UC-MSCs



* $P < 0.05$.

图3 qRT-PCR检测IFN- γ 作用后早期和晚期代数UC-MSCs中IDO-1的mRNA水平的表达

Fig.3 The mRNA expression level of IDO-1 in early and late passage UC-MSCs primed by IFN- γ was detected by qRT-PCR



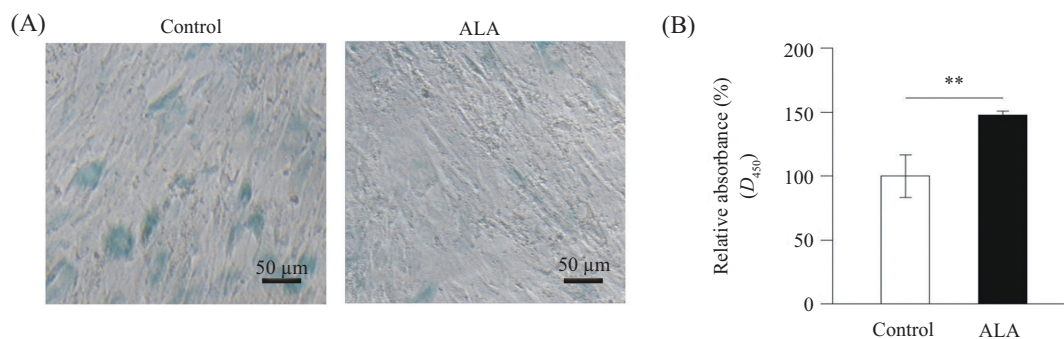
* $P < 0.05$.

图4 CFSE染色检测与早期和晚期代数UC-MSCs共培养后对PHA激活的PBMC的增殖能力的影响

Fig.4 The proliferative ability of PBMC stimulated by PHA co-cultured with early and late passage UC-MSCs was assessed by CFSE

第5代或第18代UC-MSCs共培养后, PBMC的增殖比例都明显下降, 其中与第5代UC-MSCs共培养后下降为(13.82±3.19)%, 与第18代UC-MSCs共培养后下降

为(29.55±5.93)%。两组具有明显差异($P < 0.05$) (图4), 说明UC-MSCs复制性衰老伴随免疫抑制能力的降低。



A: β -gal染色法检测ALA处理后UC-MSCs β -半乳糖苷酶活性; B: CCK-8检测ALA处理后UC-MSCs的增殖能力, $**P < 0.01$ 。

A: β -gal staining of UC-MSCs treated with ALA; B: proliferative ability of UC-MSCs treated with ALA was detected by CCK-8, $**P < 0.01$ 。

图5 ALA处理对UC-MSCs 增殖能力和衰老表型的影响

Fig.5 Effects of ALA on the proliferative ability and senescence phenotype of UC-MSCs

2.5 NRF2激活剂ALA延缓UC-MSCs衰老并促进增殖

ALA处理UC-MSCs 3天后, 与对照组比较, ALA组的 β -gal染色阳性细胞明显减少(图5A)。CCK-8检测结果显示, ALA处理后2天后, UC-MSCs增殖能力明显增强, 其中ALA组增殖能力较对照组增强, 相对比例为147.90% ($P < 0.01$)(图5B)。以上数据说明, ALA激活NRF2能延缓UC-MSCs衰老并提高其增殖能力。

2.6 NRF2激活剂ALA增强UC-MSCs免疫抑制能力

ALA处理3天后, qRT-PCR检测显示, 对照组相比, ALA处理组的UC-MSCs中IDO-1表达增加 ($P < 0.001$)(图6A)。ALA处理UC-MSCs后, 与PHA刺激的PBMC共培养3天, 流式细胞术检测PBMC的增殖。其中与UC-MSCs共培养后PBMC的增殖比例下降为(27.21 \pm 3.56)%, 与ALA处理的UC-MSCs共培养后下降为(18.97 \pm 2.17)%, 两组具有明显差异 ($P < 0.01$)(图6B)。以上提示, ALA激活NRF2增强UC-MSCs的体外免疫抑制能力。

3 讨论

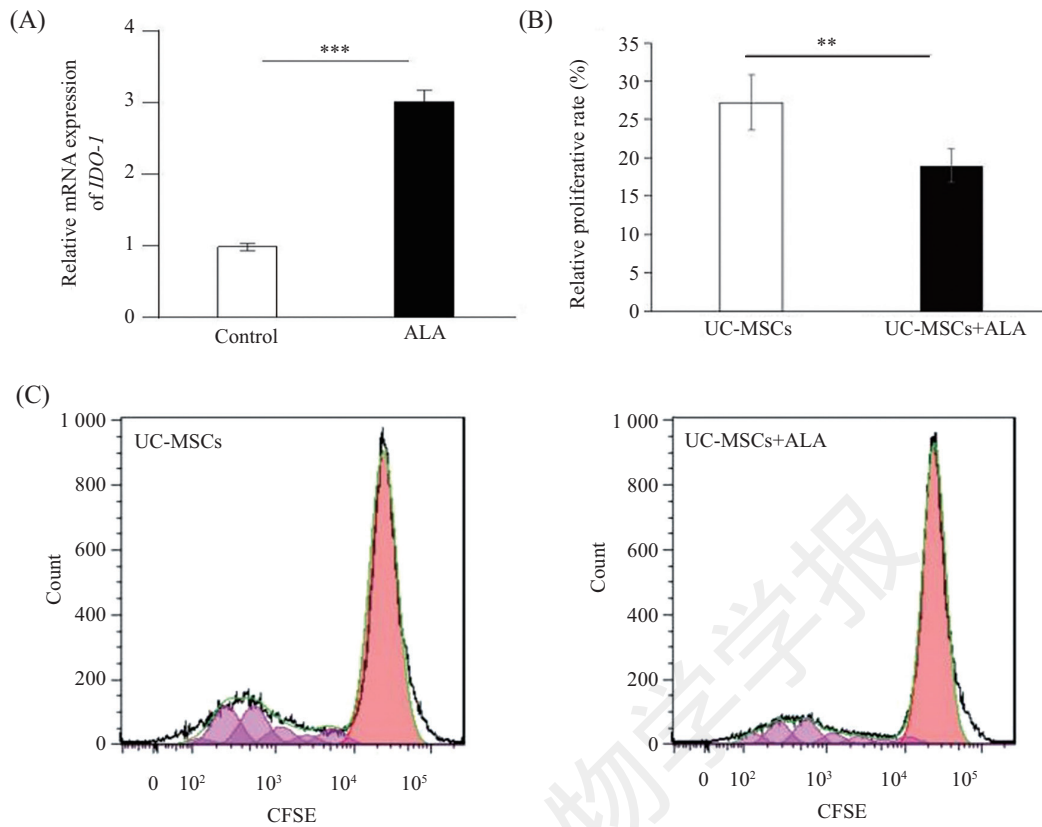
MSCs在多种免疫调节性疾病的治疗中显示出良好的作用, 大量研究表明, MSCs通过旁分泌作用和细胞相互的接触发挥其免疫调节作用, 并可能通过激活细胞内多条信号通路, 协同作用共同形成一个综合的免疫调控网络^[8]。然而, 长期体外培养不可避免地导致MSCs的复制性衰老, 可能是导致MSCs功能下降, 影响MSCs临床试验疗效的重要原因之一。我们的结果显示, UC-MSCs在长期传代后出现增殖能力降低, 生长缓慢和衰老表型以及 HP-1 γ 异

染色质凝集。与其他体细胞的体外培养相同, MSCs在体外长期扩增中也存在Hayflick界限, 使其获得复制性衰老, 避免出现染色质迷乱和肿瘤形成^[9]。

MSCs的衰老往往伴随各项功能的下降。系统性红斑狼疮病人体内的骨髓MSCs与健康个体来源的相比, 生长缓慢, 呈现衰老特征, 伴随免疫调节能力的异常^[10]。相对于年轻的骨髓MSCs, 衰老的骨髓MSCs的抗炎能力和迁移能力减弱, 炎症因子IFN- γ 刺激后分泌的细胞因子和趋化因子受体表达水平也明显降低^[11]。也有研究发现晚期代数的MSCs成骨分化能力和免疫抑制能力有所降低。我们的结果显示, 晚期代数UC-MSCs在体外抑制PBMC的能力有所下降, IFN- γ 诱导的IDO-1的表达也明显降低。IDO-1作为色氨酸代谢的限速酶, 催化色氨酸沿犬尿氨酸途径进行分解, 分解产物通过抑制T效应发挥免疫抑制作用, 在MSCs的免疫抑制作用发挥中具有重要作用^[12], 提示晚期代数的UC-MSCs显示衰老表型, 且免疫抑制功能降低。

复制性衰老导致MSCs功能的改变, 但其衰老与免疫抑制功能降低的具体机制并不清楚。NRF2是外源性有毒物质和氧化应激的感受器, 是细胞众多抗氧化反应的中枢调节者。NRF2与ARE结合, 启动下游多种保护性基因的表达^[6]。研究发现, NRF2/ARE功能受损介导的细胞抗氧化通路发生紊乱, 活性氧自由基过度增加, 是导致细胞衰老的重要原因^[13]。我们的结果发现, 随着MSCs传代的增加, NRF2及pS40-NRF2蛋白表达有下降的趋势。因此, NRF2可能影响UC-MSCs的复制性衰老过程。

NRF2的过表达能降低MSCs细胞内氧化应激引



A: ALA处理后UC-MSCs中*IDO-1*的mRNA表达, $***P < 0.001$; B: CFSE检测ALA处理UC-MSCs后对PBMC增殖的影响, $**P < 0.01$; C: CFSE检测ALA处理UC-MSCs后对PBMC增殖影响的流式图。

A: the mRNA expression of *IDO-1* in UC-MSCs treated with ALA was detected by qRT-PCR, $***P < 0.001$; B: the proliferative ability of PBMC co-culture with UC-MSCs treated with ALA was assessed by CFSE, $**P < 0.01$; C: the flow detection of proliferative ability in PBMC co-cultured with UC-MSCs treated with ALA by CFSE.

图6 ALA处理对UC-MSCs免疫抑制能力的影响

Fig.6 Effect of ALA on the immunosuppression ability of UC-MSCs

起的凋亡和细胞毒性^[14]。通过对NRF2的基因编辑增强其转录活性,可以延缓MSCs的衰老^[15]。一些能激活NRF2的药物,如二甲双胍和奥普替拉等,也能缓解MSCs的衰老^[15-16]。因此,NRF2可能作为逆转干细胞衰老的重要分子之一。ALA是一种天然的强抗氧化剂,能够激活NRF2,提高内源性抗氧化剂及II相解毒酶的水平,具有保护细胞免受氧化应激损伤的作用^[17]。本研究发现,ALA处理UC-MSCs能延缓细胞衰老进程,促进细胞增殖。

由于衰老伴随干细胞各项功能的降低,我们用ALA预处理的细胞,体外免疫抑制能力增加,提示ALA可以延缓UC-MSCs衰老并增强其免疫抑制功能。有研究表明,MSCs的复制性衰老伴随免疫调节因子表达的降低,导致治疗效果的下降。一些维持干细胞自我更新和增殖能力的因子,如BMI1能够

抑制MSCs的衰老和提高免疫调节能力^[18]。因此,从调节干细胞衰老的角度寻找增强免疫调节能力的方法,为提高干细胞临床疾病治疗效果提供新的思路。

综上所述,我们的研究发现在UC-MSCs体外扩增的过程中,复制性衰老伴随免疫抑制能力的降低,同时NRF2表达降低。NRF2激动剂处理后,能够缓解细胞的衰老,并提高UC-MSCs的体外免疫抑制能力。这些结果提示在UC-MSCs中激活NRF2可以阻止UC-MSCs的衰老,并调节*IDO-1*的表达增强其免疫抑制功能。本实验研究结果为增强UC-MSCs的临床疗效提供了可靠的实验依据,但具体机制还有待进一步研究。

参考文献 (References)

- 1 Ankrum J, Karp JM. Mesenchymal stem cell therapy: two steps

- forward, one step back. *Trends Mol Med* 2010; 16(5): 203-9.
- 2 Najar M, Raicevic G, Crompton E, Fayyad-Kazan H, Bron D, Toungouz M, *et al.* The immunomodulatory potential of mesenchymal stromal cells: a story of a regulatory network. *J Immunother* 2016; 39(2): 45-59.
 - 3 Zhao K, Lou R, Huang F, Peng Y, Jiang Z, Huang K, *et al.* Immunomodulation effects of mesenchymal stromal cells on acute graft-versus-host disease after hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2015; 21(1): 97-104.
 - 4 Chinnadurai R, Rajan D, Ng S, McCullough K, Arafat D, Waller EK, *et al.* Immune dysfunctionality of replicative senescent mesenchymal stromal cells is corrected by IFN gamma priming. *Blood Adv* 2017; 1(11): 628-43.
 - 5 Ma Q. Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2013; 53: 401-26.
 - 6 Rubiolo JA, Mithieux G, Vega FV. Resveratrol protects primary rat hepatocytes against oxidative stress damage: activation of the Nrf2 transcription factor and augmented activities of antioxidant enzymes. *Eur J Pharmacol* 2008; 591(1-3): 66-72.
 - 7 Kubben N, Zhang W, Wang L, Voss TC, Yang J, Qu J, *et al.* Repression of the Antioxidant NRF2 Pathway in Premature Aging. *Cell* 2016; 165(6): 1361-74.
 - 8 Galipeau J. The mesenchymal stromal cells dilemma--does a negative phase III trial of random donor mesenchymal stromal cells in steroid-resistant graft-versus-host disease represent a death knell or a bump in the road? *Cytotherapy* 2013; 15(1): 2-8.
 - 9 Bernardo ME, Zaffaroni N, Novara F, Cometa AM, Avanzini MA, Moretta A, *et al.* Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms. *Cancer Res* 2007; 67(19): 9142-9.
 - 10 Li X, Liu L, Meng D, Wang D, Zhang J, Shi D, *et al.* Enhanced apoptosis and senescence of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Stem Cells Dev* 2012; 21(13): 2387-94.
 - 11 Bustos ML, Huleihel L, Kapetanaki MG, Lino-Cardenas CL, Mroz L, Ellis BM, *et al.* Aging mesenchymal stem cells fail to protect because of impaired migration and antiinflammatory response. *Am J Respir Crit Care Med* 2014; 189(7): 787-98.
 - 12 Zhang Z, Han Y, Song J, Luo R, Jin X, Mu D, *et al.* Interferon-gamma regulates the function of mesenchymal stem cells from oral lichen planus via indoleamine 2,3-dioxygenase activity. *J Oral Pathol Med* 2015; 44(1): 15-27.
 - 13 Suh JH, Shenvi SV, Dixon BM, Liu H, Jaiswal AK, Liu RM, *et al.* Decline in transcriptional activity of Nrf2 causes age-related loss of glutathione synthesis, which is reversible with lipoic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(10): 3381-6.
 - 14 Mohammadzadeh M, Halabian R, Gharehbaghian A, Amirzadeh N, Jahanian-Najafabadi A, Roushbandeh AM, *et al.* Nrf-2 overexpression in mesenchymal stem cells reduces oxidative stress-induced apoptosis and cytotoxicity. *Cell Stress Chaperones* 2012; 17(5): 553-65.
 - 15 Yang J, Li J, Suzuki K, Liu X, Wu J, Zhang W, *et al.* Genetic enhancement in cultured human adult stem cells conferred by a single nucleotide recoding. *Cell Res* 2017; 27(9): 1178-81.
 - 16 Fang J, Yang J, Wu X, Zhang G, Li T, Wang X, *et al.* Metformin alleviates human cellular aging by upregulating the endoplasmic reticulum glutathione peroxidase 7. *Aging Cell* 2018; 17(4): e12765.
 - 17 Ogborne RM, Rushworth SA, O'Connell MA. Alpha-lipoic acid-induced heme oxygenase-1 expression is mediated by nuclear factor erythroid 2-related factor 2 and p38 mitogen-activated protein kinase in human monocytic cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25(10): 2100-5.
 - 18 Lee JY, Yu KR, Kim HS, Kang I, Kim JJ, Lee BC, *et al.* BMI1 inhibits senescence and enhances the immunomodulatory properties of human mesenchymal stem cells via the direct suppression of MKP-1/DUSP1. *Aging (Albany NY)* 2016; 8(8): 1670-89.