

· 生物技术与方法 ·

PKH26 标记的人羊膜间充质干细胞在宫腔粘连大鼠中的迁移示踪

阳媛, 毛艳华, 王佳, 孙聪聪, 张应凤, 陈芯培

重庆医科大学附属大学城医院 妇产科, 重庆 401331

阳媛, 毛艳华, 王佳, 等. PKH26 标记的人羊膜间充质干细胞在宫腔粘连大鼠中的迁移示踪. 生物工程学报, 2018, 34(10): 1660–1667.

Yang Y, Mao YH, Wang J, et al. *In vivo* tracing of human amniotic mesenchymal stem cells labeled with PKH26 in rat intrauterine adhesions model. Chin J Biotech, 2018, 34(10): 1660–1667.

摘要: 为了观察 PKH26 标记的人羊膜间充质干细胞 (hAMSCs) 在宫腔粘连大鼠子宫内膜中的迁移情况, 文中提取鉴定及 PKH26 标记 hAMSCs, 检测 PKH26 染色剂对 hAMSCs 生物学特性的影响; 利用机械感染双重法建立大鼠宫腔粘连模型并经尾静脉移植 PKH26 标记的 hAMSCs, 荧光共聚焦显微镜下观察 PKH26 标记的 hAMSCs 移植后在大鼠子宫内膜中的分布情况。结果显示, PKH26 染色剂对细胞的活性、周期、凋亡等无明显影响, PKH26 标记的阳性细胞主要分布在大鼠受损的子宫内膜中。表明 PKH26 标记技术是一种安全有效的示踪方法, 可用于 hAMSCs 移植在治疗宫腔粘连时的示踪研究。

关键词: PKH26, 人羊膜间充质干细胞, 宫腔粘连, 示踪

In vivo tracing of human amniotic mesenchymal stem cells labeled with PKH26 in rat intrauterine adhesions model

Yuan Yang, Yanhua Mao, Jia Wang, Congcong Sun, Yingfeng Zhang, and Xinpei Chen

Obstetrics and Gynecology Department, the University-Town Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 401331, China

Abstract: To observe the migration of human amniotic mesenchymal stem cells (hAMSCs) labeled with PKH26 in the endometrium of rats intrauterine adhesion. hAMSCs were isolated, identified and labeled with PKH26 to detect the biological characteristics of the cells. Rat intrauterine adhesion models were established using mechanical and infective method and PKH26-labeled hAMSCs were transplanted through the tail vein. The distribution of PKH26 labeled hAMSCs in the endometrium of rats were observed with the fluorescence confocal microscope. The results showed that PKH26 stain had no significant effect on cell activity, cycle, apoptosis and so on. PKH26-labeled positive cells were mainly distributed in injured

Received: January 9, 2018; **Accepted:** March 26, 2018

Supported by: The Medical and Health Program Project in Chongqing, China (No. 20141014), The Medical Specialty Construction Project in Chongqing, China (No. 2013-46).

Corresponding author: Jia Wang. Tel: +86-23-65714730; E-mail: 752203031@qq.com

重庆市医学科研计划项目 (No. 20141014), 重庆市卫生局妇科微创诊治特色专科项目 (No. 2013-46) 资助。

endometrium of rats. It shows that the PKH26 labeling technique is a safe and effective method for tracing the human amniotic mesenchymal stem cells in the treatment of intrauterine adhesions.

Keywords: PKH26, human amniotic mesenchymal stem cells (hAMSCs), intrauterine adhesions (IUA), trace

目前, 宫腔粘连的治疗仍是妇产科疾病的重大难题之一。近年来, 有研究表明间充质干细胞 (Mesenchymal stem cell, MSC) 可成功修复受损的子宫内膜^[1]。其中人羊膜间充质干细胞 (Human amniotic mesenchymal stem cells, hAMSCs) 可从健康剖宫产妇产后废弃胎盘最内层的羊膜组织中分离培养获得, 具有来源充足、无创伤性、无伦理学的问题、自我增殖能力强、低免疫原性和多向分化潜能等优势^[2-6], 成为更为理想的细胞移植的来源^[7], 为治疗宫腔粘连带来了新的思路。然而, hAMSCs 移植人体内以后的去处以及其发挥的治疗作用尚不清楚。因此, 提供一个简便有效的体内示踪方法, 研究移植细胞在体内存活、迁移、分布等已成为干细胞移植研究领域的重要环节。大量研究表明 PKH26 染料标记人脐带间充质干细胞及骨髓间充质干细胞等的示踪研究^[8-10]。然而 PKH26 标记的 hAMSCs 在大鼠宫腔粘连子宫内膜的迁移示踪情况的报道较少。本研究采用 PKH26 对 hAMSCs 进行体外标记, 观察其对细胞形态、增殖、活性、周期等生物学特征的影响, 并通过尾静脉移植于宫腔粘连大鼠体内, 观察其在大鼠子宫内膜组织中迁移情况, 为 hAMSCs 移植治疗宫腔粘连的研究提供一个有效的示踪方法, 为下一步研究 hAMSCs 移植的作用奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 羊膜来源

取自重庆医科大学附属第一医院产科, 获得产妇同意且排除各种传染性疾病的正常足月剖宫产分娩的胎盘, 于无菌条件下剥离羊膜组织。本实验经重庆医科大学伦理委员会 (20141230) 批

准, 所有方法均按照有关规定执行。

1.1.2 实验动物

选取 SPF 级健康雌性 SD 大鼠 15 只, 购自重庆医科大学实验动物中心。体质量 220–250 g, 每 5 只一笼, 常规喂养。

1.2 方法

1.2.1 hAMSCs 的分离、培养、鉴定

无菌条件下剥离羊膜组织, 用 PBS 反复冲洗除去残留血液及绒毛膜并将其剪成约 1 mm × 1 mm × 1 mm 组织碎块。加入 0.05% 胰蛋白酶于 37 °C 水浴锅中消化 30 min, 反复 2 次, 离心弃上清液。然后加入 0.1 mg/mL I 型胶原酶 37 °C 消化 1 h。200 目细胞筛过滤, 收集细胞滤液, 离心、培养于含 12% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液中, 在 37 °C、5% CO₂ 的恒温培养箱中孵育。2–3 d 更换培养基一次, 待细胞长至 85%–90% 融合时传代。取第 3 代细胞用流式细胞仪检测细胞膜免疫表型 CD29、CD34、CD90、HLA-DR 的表达, 并做阴性对照检测; 用免疫荧光检测 hAMSCs 间充质细胞标志物波形蛋白和上皮细胞标志物角蛋白的表达。

1.2.2 PKH26 标记羊膜间充质干细胞

取第 3 代 hAMSCs 消化成单细胞悬液, 用 PBS 清洗一遍, 离心, 小心弃上清液 (剩余上层细胞体积不多于 25 μL)。按照 PKH26 (Sigma 公司) 试剂盒说明书加入 1 mL 稀释液 C, 轻轻吹打混匀制成细胞悬液。在染色前, 配置好 4 × 10⁻⁶ mol/L 染色工作液, 快速将细胞悬液加入到染色液中充分混匀孵育 1–5 min。加入 2 mL 的血清终止反应, 孵育 1 min 以结合多余染液。离心弃上清, 用 10 mL 完全培养基重悬细胞, 移至另一新的离心管中, 反复清洗 2 遍。重悬至实验所需的细胞浓

度。细胞涂片, 荧光镜下观察细胞, 计算荧光标记率。将细胞常规传代培养, 观察单次标记后在体外检测到 PKH26 荧光的时间, 每次传代前于荧光镜下观察显色情况。

1.2.3 细胞活性和增殖的检测

取第3代标记和未标记的 hAMSCs, 用 CCK-8 试剂盒检测其活性及增殖能力, 计算存活率并绘制生长曲线。按照试剂盒说明书操作每孔加入 100 μ L (含细胞数约为 1 000 个) 细胞悬液接种于 96 孔板中。每次取 5 孔检测 hAMSCs 活性, 重复 3 次; 每天相同时间取 3 孔, 共 6 d 检测细胞的增殖能力。用全自动酶标仪检测 450 nm 处的吸光度, 取均值。存活率=(标记组 OD 值-空白孔 OD 值)/(未标记组 OD 值-空白孔 OD 值); 以培养时间为横坐标、相应的吸光度值为纵坐标, 绘制生长曲线。

1.2.4 细胞周期和凋亡的检测

取第3代标记和未标记的 hAMSCs, 用流式细胞仪检测细胞周期和凋亡率。

1.2.5 建立大鼠宫腔粘连模型

参照蔡慧华等^[11]的方法建模。选用 15 只 SD 大鼠, 随机分为 3 组, 每组 5 只。每日上午经阴道涂片检查, 确认有动情周期。空白对照组不予处理; 实验组建立宫腔粘连模型, 腹腔注射 5%、2 mL/只的水合氯醛麻醉。严格遵守无菌原则, 于大鼠的下腹正中部纵行切开一长约 3-4 cm 的切口, 分离组织进入腹腔, 暴露子宫。在距宫体交界处 1 cm 的左宫角横切开一微小切口, 自该切口用自制的小刮勺向宫角远端搔刮左侧子宫腔 4 圈, 搔刮长度约 4 cm, 停止搔刮。于宫腔内留置已备好的脂多糖棉线, 同法处理右侧子宫角。生理盐水冲洗腹腔, 缝合切口。留置约 2 cm 的棉线残端于腹部, 2 d 后轻拉尾丝, 取出宫内棉线, 建模后经尾静脉移植 1 mL PKH26 标记的 hAMSCs (含 2×10^6 个); 实验对照组按实验组方法建模, 建模后经尾静脉注射等体积的 PBS 液。

1.2.6 荧光共聚焦显微镜下观察 hAMSCs 在大鼠子宫内中的分布

hAMSCs 移植后 14 d, 收集大鼠子宫组织行冰冻切片, 荧光共聚焦显微镜下观察 PKH26 标记的 hAMSCs 在子宫中的分布情况。

1.3 统计学处理

采用 SPSS19.0 软件进行统计学分析, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 hAMSCs 形态观察、表面标志物特征及 PKH26 标记效果

hAMSCs 贴壁生长, 形态呈梭形或多角形, 排列紧密, 胞体拉伸, 单层放射状或漩涡状生长, 传代后细胞增殖迅速, 约 3-4 d 可铺满全层 (图 1)。流式细胞仪检测 hAMSCs 高表达 CD29、CD90 (95% 以上), 几乎不表达 CD34、HLA-DR (图 2), 类似于文献报道的间充质干细胞的表型表达^[9]。免疫荧光染色显示 hAMSCs 表达波形蛋白, 而不表达角蛋白 (图 3), 说明提取的 hAMSCs 纯度较高。PKH26 标记阳性率 100%; CCK-8 检测显示标记细胞的存活率高达 99%。第 3 代 hAMSCs 首次 PKH26 染色后, 经过 4 次传代, 每代 3-5 d, 随着细胞的传代荧光强度逐渐减弱 (图 4)。

2.2 hAMSCs 标记组与未标记组的细胞增殖能力的检测

CCK-8 检测对两组细胞进行细胞增殖能力的检测, 结果显示: 第 3-5 天细胞增殖速度较快, 为对数增长期; 之后细胞生长进入平台期。两组差异无统计学意义 ($t=0.9245$) (图 5)。

2.3 hAMSCs 标记组与未标记组的细胞凋亡检测

对两组的各类细胞比例行独立样本 t 检验, 差异无统计学意义 ($P=0.8789$), 说明 PKH26 标记 hAMSCs 不影响细胞的凋亡 (图 6)。

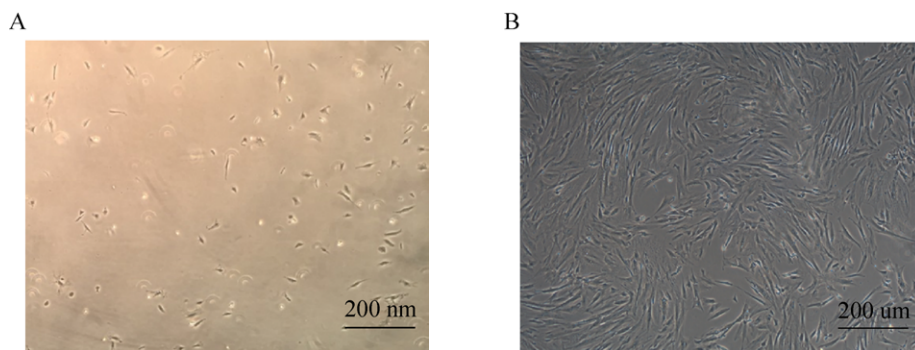


图 1 人羊膜间充质干细胞在显微镜下的形态

Fig. 1 Morphology of human amniotic mesenchymal stem cells under microscope. (A) The primary cells in the third day. (B) Cells after passage.

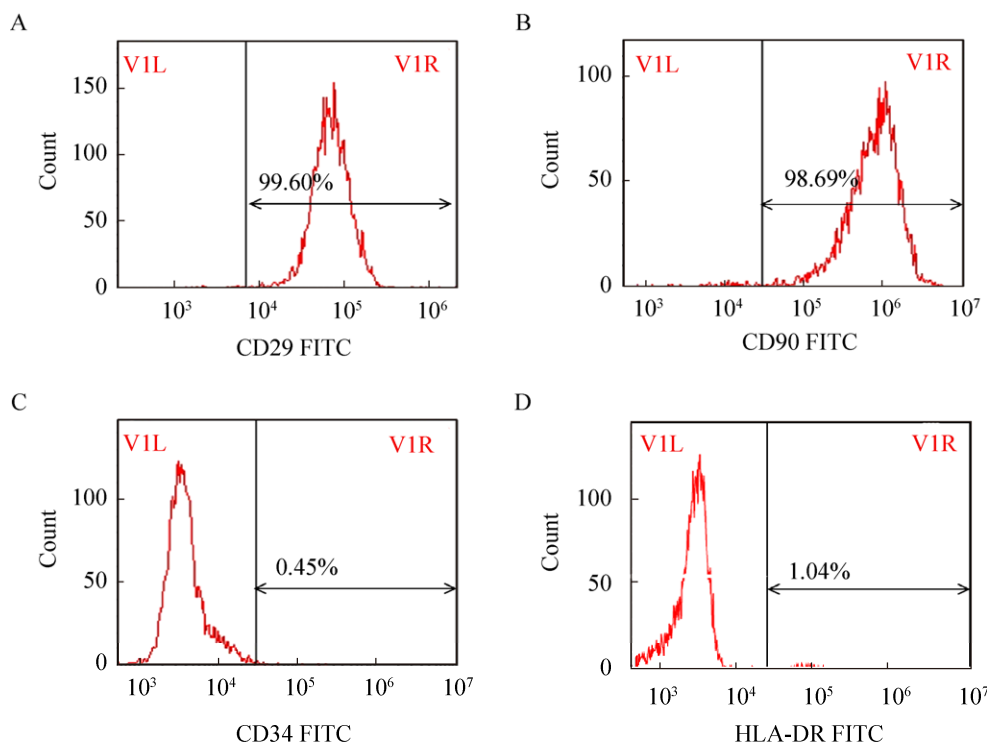


图 2 人羊膜间充质干细胞免疫表型测定

Fig. 2 The immunophenotype of human amniotic mesenchymal stem cells. (A) CD29 (99.60%, positive). (B) CD90 (98.69%, positive). (C) CD34 (0.45%, negative). (D) HLA-DR (1.04%, negative).

2.4 hAMSCs 标记组与未标记组细胞的周期检测

两组的大部分细胞处于 DNA 合成前期 (G1 期), 少数细胞处于 DNA 复制期 (S 期)、DNA 合成后期 (G2) 和有丝分裂期 (M 期)。两组各期的细胞比例差异无统计学意义 ($P=0.9803$), 说明

PKH26 标记 hAMSCs 不影响细胞的周期 (图 7)。

2.5 hAMSCs 移植后在子宫中的分布情况

荧光共聚焦显微镜下可见 PKH26 标记阳性的 hAMSCs 散在分布在大鼠子宫内膜中, 呈红色荧光。对照组和实验对照组基本未见红色荧光 (图 8)。

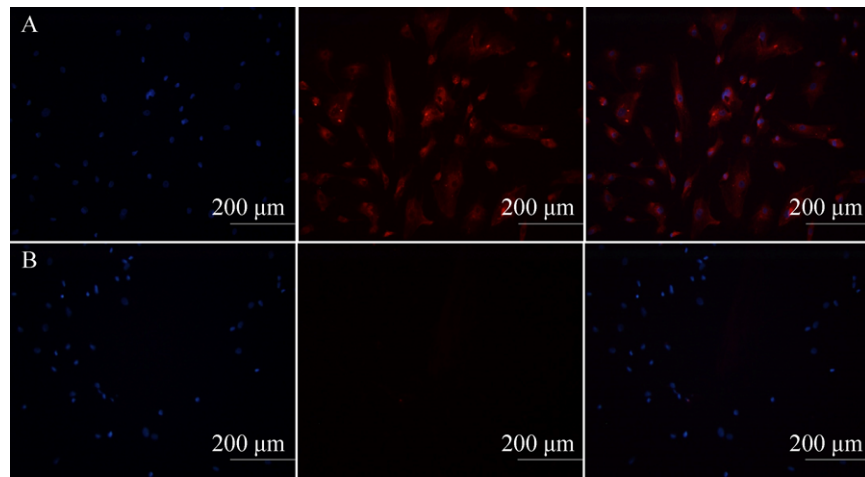


图 3 人羊膜间充质干细胞波形蛋白 (A)、角蛋白 (B) 的表达情况

Fig. 3 Expression of vimentin (A) and keratin (B) in amniotic mesenchymal stem cells.

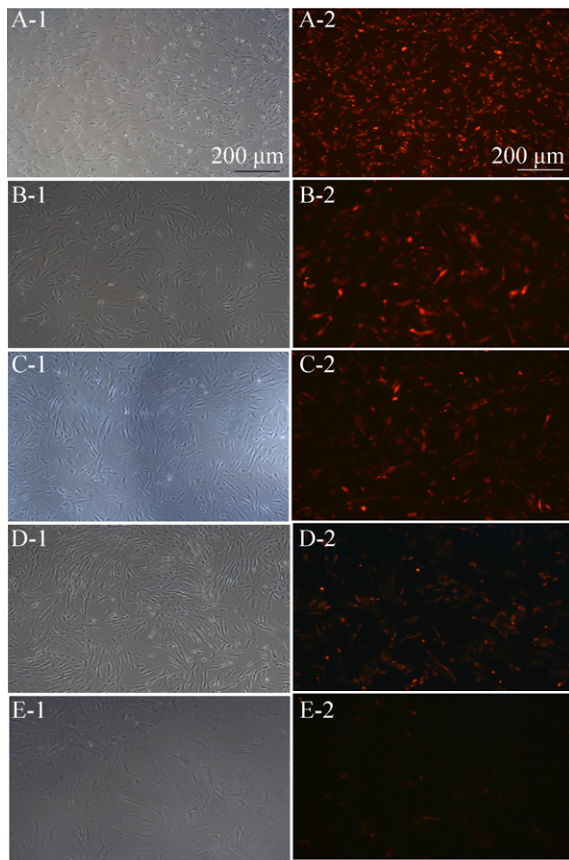


图 4 PKH26 标记的人羊膜间充质干细胞

Fig. 4 Human amniotic mesenchymal stem cells labeled by PKH26. (A) P3 generation cells stained for the first time by PKH26. (B-E) Fluorescence staining of 2, 3, 4 and 5 passages cells.

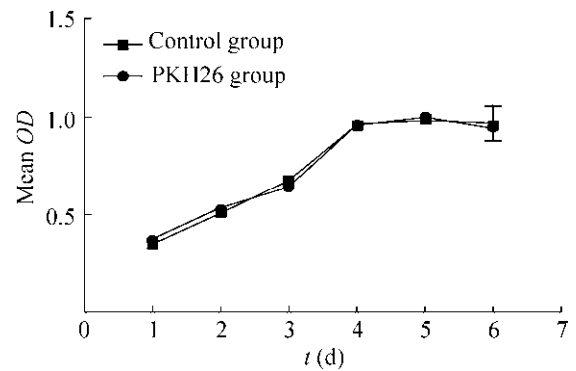


图 5 人羊膜间充质干细胞 PKH26 标记组和未标记组的细胞增殖检测

Fig. 5 Cell proliferation of human amniotic mesenchymal stem cells in PKH26 and unmarked groups.

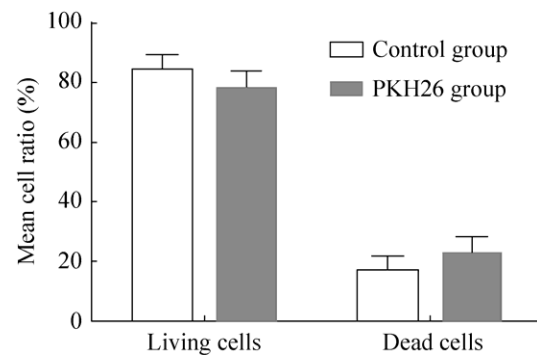


图 6 人羊膜间充质干细胞 PKH26 标记组和未标记组的细胞凋亡检测

Fig. 6 Cell apoptosis detection of human amniotic mesenchymal stem cells in PKH26 and unmarked groups.

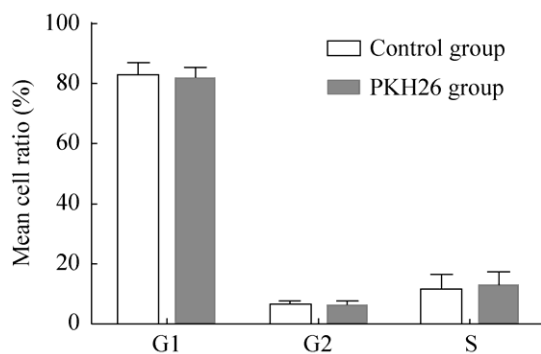


图7 人羊膜间充质干细胞 PKH26 标记组和未标记组的细胞周期检测

Fig. 7 Cell cycle detection of human amniotic mesenchymal stem cells in PKH26 and unmarked groups.

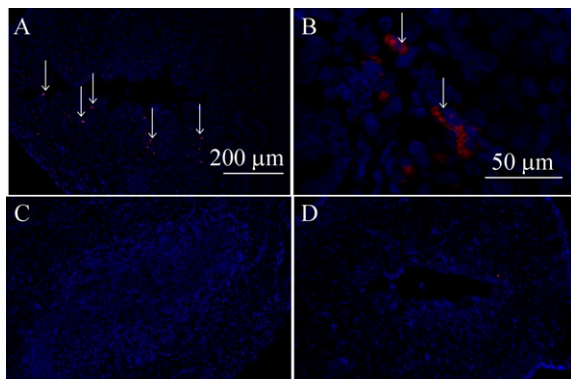


图8 荧光共聚焦显微镜下观察 PKH26 标记的 hAMSCs 在大鼠子宫内膜的分布情况

Fig. 8 Distribution of PKH26 labeled hAMSCs in the endometrium of rats under the fluorescence confocal microscopy. (A, B) Experimental group. (C) Experimental control group. (D) Control group.

3 讨论

本课题组人员临床研究发现羊膜移植可有效改善宫腔粘连患者术后再粘连、月经等情况^[12]，但其中的作用机制尚不清楚。有学者认为宫腔粘连的形成可能与子宫内膜基层干细胞功能受损和数量减少甚至缺失有关^[13]，而子宫内膜的再生修复需要一定数量的子宫内膜干细胞^[14]。目前已有研究证实羊膜中含有干细胞样细胞，且整张羊

膜可产生高达 4×10^8 个 hAMSCs^[15]。羊膜间充质干细胞具有自我更新、较强的分化潜能，在体外可向胰岛样细胞（内胚层）^[16]、成骨细胞、脂肪细胞（中胚层）^[17]、神经细胞（外胚层）^[18-19]等 3 个胚层的不同类型细胞分化。多项研究也表明 hAMSCs 是修复重建受损组织、器官功能的理想种子细胞^[20]。因此，如何选用一种简便、有效的方法标记 hAMSCs，了解其在体内迁移及修复子宫内膜的机制是亟待解决的问题。

PKH26 是一种荧光染料，具有亲脂性，可与细胞膜的脂质双分子层发生不可逆的结合，产生红色荧光，标记物可随细胞分裂平均分配给子细胞。目前广泛用于多种细胞或其他含颗粒胞膜的标记^[21-23]，对细胞无明显毒副作用^[24]，不影响细胞原有的生物学特性^[25]，且可重复性好。既往实验表明，细胞移植后 PKH26 染料不会在已标记和未标记的细胞间传递，且不会从凋亡或死亡的细胞中释放出来，可精确区分移植细胞和宿主细胞^[21]。PKH26 能稳定存留于体内 6 个月^[26]，甚至有标记神经干细胞超过 1 年的记录^[21]，目前成为研究细胞迁移示踪的理想工具。

因此，本研究对 hAMSCs 进行 PKH26 荧光标记。标记后细胞形态和细胞生长状态、细胞周期和凋亡均无明显变化。CCK-8 实验检测 PKH26 标记后细胞存活率 >95%，表明该染料不影响细胞的活性，无细胞毒性作用。PKH26 首次标记后，荧光强度随着细胞传代逐渐减弱，这可能与染料随着细胞分裂平均分配到子代细胞有关^[27]。标记的细胞经过 4 次传代仍可观察到荧光显色，这说明标记的 hAMSCs 至少在 20 d 内可以被检测出。此外，hAMSCs 移植后 2 周在实验组大鼠的子宫内膜层可观察到红色荧光，而在对照组和实验对照组未见红色荧光。由此推测，受损的子宫可能启动了体内的某些信号系统，当 hAMSCs 移植入体内后，经血迁移至子宫，并停留于此。然而本

实验只观察了 hAMSCs 移植后 2 周的子宫组织情况, 在今后的研究中, 将继续观察 hAMSCs 在体内远期的迁移、增殖分化情况, 并检测 hAMSCs 对宫腔粘连的治疗效果及作用机制。

REFERENCES

- [1] Singh N, Mohanty S, Seth T, et al. Autologous stem cell transplantation in refractory Asherman's syndrome: a novel cell based therapy. *J Hum Reprod Sci*, 2014, 7(2): 93–98.
- [2] Lindenmair A, Hatlapatka T, Kollwig G, et al. Mesenchymal stem or stromal cells from amnion and umbilical cord tissue and their potential for clinical applications. *Cells*, 2012, 1(4): 1061–1088.
- [3] Zhu YZ, Yang YX, Zhang YL, et al. Placental mesenchymal stem cells of fetal and maternal origins demonstrate different therapeutic potentials. *Stem Cell Res Ther*, 2014, 5(2): 48.
- [4] Antoniadou E, David AL. Placental stem cells. *Best Prac Res Clin Obstet Gynaecol*, 2016, 31: 13–29.
- [5] Jin Y, Li YW, Zhang CH, et al. Experimental research of differentiation of human amniotic mesenchymal stem cells into ligament cell *in vitro*. *Chin J Reparat Reconstruct Surg*, 2016, 30(2): 237–244 (in Chinese).
金瑛, 李豫皖, 张承昊, 等. 体外诱导人羊膜间充质干细胞向韧带细胞分化的实验研究. *中国修复重建外科杂志*, 2016, 30(2): 237–244.
- [6] Filioli Uranio M, Dell'Aquila ME, Cairra M, et al. Characterization and *in vitro* differentiation potency of early-passage canine amnion-and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells as related to gestational age. *Mol Reprod Dev*, 2014, 81(6): 539–551.
- [7] Insausti CL, Blanquer M, Bleda P, et al. The amniotic membrane as a source of stem cells. *Histol Histopathol*, 2010, 25(1): 91–98.
- [8] Wang T, Sun SJ, Wan Z, et al. Effects of bone marrow mesenchymal stem cells in a rat model of myocardial infarction. *Resuscitation*, 2012, 83(11): 1391–1396.
- [9] Peng Y, He YL, Zhu SF. Rat bone marrow mesenchymal stem cells labeled and tracked with PKH26. *Chin J Tissue Eng Res*, 2012, 16(14): 2487–2490 (in Chinese).
彭艳, 何援利, 朱少芳. 大鼠骨髓间充质干细胞的 PKH26 标记和示踪. *中国组织工程研究*, 2012, 16(14): 2487–2490.
- [10] Xue G, Li JL, Liu JF, et al. *In vivo* tracking of PKH26-labeled human umbilical cord mesenchymal stem cells after transplantation into rats with liver cirrhosis. *Chin J Hepatol*, 2014, 22(12): 910–914 (in Chinese).
薛改, 李建立, 刘建芳, 等. PKH26 标记示踪人脐带间充质干细胞在肝硬化大鼠体内的迁移. *中华肝脏病杂志*, 2014, 22(12): 910–914.
- [11] Cai HH, He YL, Li HJ, et al. Correlation between interleukin-21 and formation of intrauterine adhesions in rats. *J Med Postgrad*, 2015, 28(4): 346–349 (in Chinese).
蔡慧华, 何援利, 李慧娟, 等. 宫腔粘连大鼠模型的建立及其与白细胞介素 21 的相关性分析. *医学研究生学报*, 2015, 28(4): 346–349.
- [12] Cai AQ, Wu BY, Wang J. Effect of fresh amnion graft on menstrual pattern for patients with moderate to severe intrauterine adhesion. *J Chongqing Med Univ*, 2017, 42(4): 424–428 (in Chinese).
蔡艾杞, 吴本媛, 王佳. 新鲜羊膜移植对中、重度宫腔粘连月经模式的影响. *重庆医科大学学报*, 2017, 42(4): 424–428.
- [13] Gargett CE, Ye L. Endometrial reconstruction from stem cells. *Fertil Steril*, 2012, 98(1): 11–20.
- [14] Shoaie-Hassani A, Mortazavi-Tabatabaei SA, Sharif S, et al. Differentiation of human endometrial stem cells into urothelial cells on a three-dimensional nanofibrous silk-collagen scaffold: an autologous cell resource for reconstruction of the urinary bladder wall. *J Tissue Eng Regenerat Med*, 2015, 9(11): 1268–1276.
- [15] Zhang R, Duan H. Amniotic membrane transplantation in the prevention of intrauterine adhesions. *Chin J Obstet Gynecol*, 2012, 47(6): 470–472 (in Chinese).
张冉, 段华. 羊膜移植在预防宫腔粘连中的应用. *中华妇产科杂志*, 2012, 47(6): 470–472.
- [16] Zhang YM, Wang DL, Zeng HY, et al. Differentiation of human amniotic mesenchymal stem cells into insulin-secreting cells induced by the regenerating pancreatic extract. *Chin J Biotechnol*, 2012, 28(2): 214–221 (in Chinese).
张艳梅, 王佃亮, 曾虹燕, 等. 再生胰腺提取物诱导人羊膜间充质干细胞定向分化为胰岛素分泌细胞. *生物工程学报*, 2012, 28(2): 214–221.
- [17] Ulusoy O I A, Nayır Y, Darendeliler-Yaman S, et al. Effect of different root canal sealers on fracture strength

- of simulated immature roots. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2011, 112(4): 544–547.
- [18] Li F, Miao ZN, Xu YY, et al. Transplantation of human amniotic mesenchymal stem cells in the treatment of focal cerebral ischemia. *Mol Med Rep*, 2012, 6(3): 625–630.
- [19] Kim KS, Kim HS, Park JM, et al. Long-term immunomodulatory effect of amniotic stem cells in an Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 2013, 34(10): 2408–2420.
- [20] Zhang DS, Shi MX, Dong J. Advances in preclinical research on human amniotic mesenchymal stem cells. *Chongqing Med*, 2015, 44(9): 1268–1270 (in Chinese). 张递思, 史明霞, 董坚. 人羊膜间充质干细胞的临床前研究进展. *重庆医学*, 2015, 44(9): 1268–1270.
- [21] Modo M, Beech JS, Meade TJ, et al. A chronic 1 year assessment of MRI contrast agent-labelled neural stem cell transplants in stroke. *Neuroimage*, 2009, 47 Suppl 2: T133–T142.
- [22] Zhang XM, Du F, Yang D, et al. Therapeutic potential of bone marrow-derived mononuclear cells for experimental cerebral ischemia in mice. *Neural Regen Res*, 2010, 5(23): 1765–1772.
- [23] Zhu SF, He YL, Fu XF, et al. *In vivo* tracking of PKH26labeled human umbilical cord mesenchymal stem cells after transplantation into rats of chemotherapy-induced premature ovarian failure. *Progr Obstet Gynecol*, 2011, 20(2): 92–96 (in Chinese). 朱少芳, 何援利, 付霞菲, 等. PKH26 标记的人脐带间充质干细胞在大鼠化疗性卵巢早衰模型中的卵巢迁移. *现代妇产进展*, 2011, 20(2): 92–96.
- [24] Li P, Zhang R, Sun HT, et al. PKH26 can transfer to host cells *in vitro* and *vivo*. *Stem Cells Dev*, 2013, 22(2): 340–344.
- [25] Pastò A, Marchesi M, Diamantini A, et al. PKH26 staining defines distinct subsets of normal human colon epithelial cells at different maturation stages. *PLoS ONE*, 2012, 7(8): e43379.
- [26] Han Y, Pang CJ, Lan N, et al. Labeling and tracing bone marrow mesenchymal stem cells with PKH-26 *in vivo*. *J Clin Rehabil Tissue Eng Res*, 2011, 15(45): 8469–8473 (in Chinese). 韩云, 庞超见, 蓝妮, 等. PKH-26 标记骨髓间充质干细胞气管移植的体内示踪. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(45): 8469–8473.
- [27] Ye XF, He YL, Fu XF, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation for treatment of cis-platinum-induced ovarian damage. *China Tissue Eng Res*, 2015, 19(10): 1597–1602 (in Chinese). 叶小凤, 何援利, 付霞菲, 等. 骨髓间充质干细胞移植治疗顺铂致卵巢的化疗性损伤. *中国组织工程研究*, 2015, 19(10): 1597–1602.

(本文责编 郝丽芳)