

# PKH67 示踪骨髓间充质干细胞迁移至损伤脊髓的实验研究

马娇 张雪梅 孙杨 俞冰倩

**【摘要】 目的** 探讨 SCI 后体外移植 PKH67 标记的 BMSCs 迁移至脊髓损伤处并进行增值和分化的动员情况。**方法** 用梯度离心法分离和培养出 SD 大鼠第 3 代 BMSCs,用绿色荧光染料 PKH67 标记;采用钳夹法制备脊髓损伤(SCI)模型,分为实验组( $n=15$ )、对照组( $n=16$ )、假手术组( $n=16$ );SCI 术后对脊髓损伤组织进行 HE 染色,实验组和假手术组于术后尾静脉移植含有  $1 \times 10^7$  个 BMSCs 的 0.5 mL 生理盐水,对照组注射等量生理盐水;分别于术后 1、7、14、21 d 观察大鼠后肢运动功能恢复情况,并做 BBB 分;术后 21 d 后取脊髓组织,行免疫荧光染色,观察 BMSCs 的迁移,增值和分化情况。**结果** (1)镜下可见损伤脊髓形成的空洞、坏死及炎性细胞的增多;(2)共聚焦荧光显微镜观察显示术后 21 d 实验组脊髓损伤部位可见移植的 BMSCs,部分 BMSCs 呈 GFAP 和 Nestin 阳性表达;假手术组无 PKH67 标记的 BMSCs;实验组 GFAP 和 Nestin 阳性细胞数较对照组和假手术组明显增加( $P<0.05$ ),对照组较假手术组增加不明显( $P>0.05$ );(3)实验组和对照组 BBB 评分均有增加,但实验组 BBB 评分显著高于对照组( $P<0.05$ )。**结论** PKH67 示踪的 BMSCs 可迁移至损伤脊髓部位,进行增值并分化为神经元样细胞,促进损伤脊髓的神经功能恢复。

**【关键词】** PKH67 骨髓间充质干细胞 脊髓损伤 增值

**【中图分类号】** R744 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2016)06-0432-06

**【DOI】** 10.3969/j.issn.1007-0478.2016.06.012

**Study on the utilization of PKH67 in the transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells to injured spinal cord** Ma Jiao, Zhang Xuemei, Sun Yang, et al. Department of Neurology, Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086

**【Abstract】 Objective** To investigate the utilization of PKH67 in the transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells to injured spinal cord and the migration, proliferation and differentiation of the BMSCs. **Methods** Density gradient centrifugation method was used for isolating the rat BMSCs and the 3rd passage of BMSCs were labeled with green fluorescent dye PKH67. SCI model was generated by using aneurysm clip to clamp the the spinal cord of the rat. There were three groups: BMSCs group, sham operation group and

control group. After SCI, the lesion of spinal cord was taken for HE,  $1.0 \times 10^7$  cells labeled with PKH67 in 0.5 mL 0.9% sterile saline solution were transfused intravenously in BMSCs group and sham-operation group, the same volume of sterile saline solution were transfused in control group. The BBB scale was performed at 1 day, 7 days, 14 days, 21 days after surgery for evaluating hind limbs movement. The migration and differentiation of BMSCs were determined by using triple immunofluorescent staining. **Results** (1) Syringomyelia after injury, necrosis and increased inflammatory cells could be seen under microscopy. (2) Immunofluorescence analysis were performed at 21 days post-transplantation and the transplanted BMSCs were centralized in the epicenter of injured spinal cord, part of BMSCs expressed by GFAP and Nestin. There were no PKH67<sup>+</sup> cells in sham operation group. The GFAP<sup>+</sup> and Nestin<sup>+</sup> cells in BMSCs group were significantly higher than other two groups ( $P < 0.05$ ), while there was no obviously difference between sham operation group and control group ( $P > 0.05$ ). (3) The BBB scores of BMSCs group and control group both improved, but the rats in BMSCs group improved rapidly than control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The bone marrow mesenchymal stem cells labeled with PKH67 could migrate to the lesion of spinal cord, proliferate and differentiate into neurocyte-like cells, which could promote the recovery of spinal cord's function.

**【Key words】** PKH67 Bone marrow mesenchymal stem cells Spinal cord injury Proliferation

随着工矿事业和现代交通事业的发展,脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)的发病率近几年在不断上升,SCI是以损伤平面以下感觉、运动神经系统功能丧失的中枢神经系统严重疾病。虽然现在有类固醇类、金属蛋白酶抑制剂、蛋白激酶抑制剂和再生技术等多种方法来改善SCI患者的症状,但是效果都有限<sup>[1~2]</sup>。近年随着生物学和分子生物学的发展,干细胞移植已经成为一种有效的治疗手段<sup>[3]</sup>。其中,骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)因为其具有易于提取和培养、多向分化、低免疫原性等能力已经成为众多学者的研究方向<sup>[4~5]</sup>,并且已经应用于临床治疗SCI<sup>[6]</sup>。但目前仍存在许多问题需要解决,其中主要问题之一就是移植细胞在体内的迁移、增值和分化情况。为了追踪并观察移植细胞在宿主体内的存活、迁移和分化情况就必须对移植细胞加以标记,以便识别和监测。目前,已经有研究者用PKH26及基因转染的方法标记<sup>[7~9]</sup>,而用绿色荧光染料PKH67标记BMSCs的研究却鲜有报道。本实验采用绿色荧光染料PKH67标记BMSCs,探讨SCI后体外移植PKH67标记的骨髓间充质干细胞迁移至损伤处并进行增值和分化的动员情况。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及主要试剂、仪器

成年雌性SD大鼠47只,体重200~220 g;1月龄雄性SD鼠8只,体重40~60 g;均由哈尔滨医科大学附属第二医院实验动物中心提供,动物质量合格证号为SCXK(黑)2013-001,实验中对动物处

置均符合中华人民共和国科学技术部2016年发布的《关于善待实验动物的指导性意见》<sup>[10]</sup>,获得哈尔滨医科大学伦理委员会批准(审查编号为HMUIRB20150029)。主要试剂与仪器:PKH67试剂盒(PKH67染料1瓶,0.1 mL,稀释液C1瓶,10 mL, Sigma公司);DMEM/F12(Hyclone公司);胎牛血清(ScienCell公司);淋巴细胞分离液(天津灏洋);兔单克隆抗体GFAP,小鼠单克隆抗体Nestin(Abcam公司);FV-1000共聚焦荧光显微镜(Olympus公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 BMSCs的制备及培养 取8只1月龄雄性SD大鼠,10%水合氯醛腹腔注射麻醉,体积分数75%乙醇全身浸泡消毒10 min;无菌环境中取股骨及胫骨,PBS浸泡;在超净台中用无菌器械剥去肌肉组织,剪掉股骨及胫骨的骨髓端,用5.0 mL灭菌注射器抽取4.0 mL DMEM-F12培养基,冲出骨髓,反复吹打,收入无菌离心管中。向骨髓细胞悬液中缓缓加入与之相等的淋巴细胞分离液,2500 r/min,离心30 min;取出离心管可见液体分4层(图1),用无菌吸管吸取第2层(从上向下数)云雾状液体,移入另一离心管中,用5.0 mL DMEM培养基洗涤1次,1500 r/min,离心5 min,弃上清,加入4.0 mL含10%胎牛血清的培养液,充分吹打混匀至单细胞悬液,接种于无菌透气培养瓶中;置于37℃、体积分数5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度培养箱中培养;3 d后首次换液,以后每3 d换液1次,1周后当细胞生长融合达80%以上时,以0.25%胰蛋白酶消化后按1:2比例进行传代培养,倒置显微镜下观察细胞形态及生长情况。

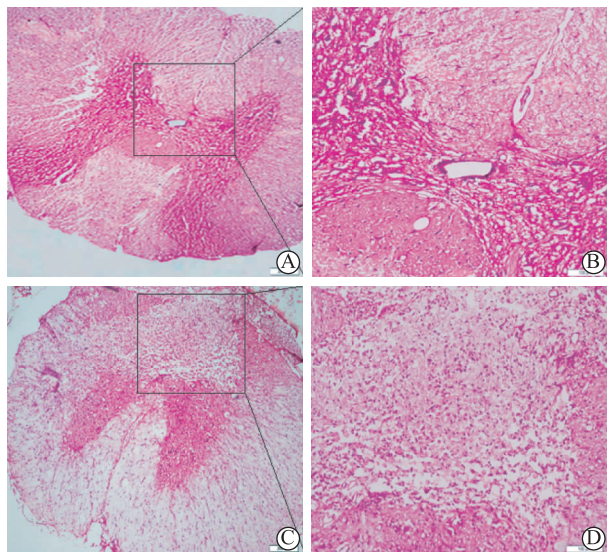


图1 正常脊髓和损伤脊髓组织形态  
(HE染色 $\times 40$ ,  $\times 100$ 倍)

**1.2.2 PKH67 标记 BMSCs** 首先将含  $2 \times 10^7$  细胞的悬液放于离心管中,用无血清培养基 DMEM 洗 1 次;400 r/min 离心 5 min,弃去上清,使细胞团上剩余液体小于  $25.0 \mu\text{L}$ ;染色前准备  $2 \times$  细胞染料 ( $4 \times 10^{-6} \text{M}$ ) 用稀释液 C 稀释,即在 1.0 mL 稀释液 C 中加  $4.0 \mu\text{L}$  的 PKH67 染料,置于离心管中,充分混匀;准备  $2 \times$  细胞悬液即加 1.0 mL 稀释液 C 到细胞团中,重悬细胞保证完全离散,但注意不要旋转震荡,不要让细胞在稀释液中存留太长时间;尽快加 1.0 mL 的  $2 \times$  细胞悬液到 1.0 mL  $2 \times$  染料悬液中,立即用吸管均匀快速混合样品;在混匀的预定体积中最终浓度将是  $2 \times 10^{-6} \text{M}$  PKH67 染料和  $1 \times 10^7$  细胞;25 °C 孵育含有细胞和染料的悬液 5 min,定期混匀;然后加入等量 (2.0 mL) 的血清或其他合适的蛋白溶液 (1% BSA) 终止染色反应;充分混匀,孵育 1 min 来和过量的染料结合;25 °C 细胞离心,400 r/min,10 min,弃去上清;向离心管中加入 10.0 mL 完全培养液,重悬细胞团,然后移到新试管中,25 °C 离心,400 r/min,5 min;弃去上清后用 10.0 mL 完全培养基清洗细胞团 2 次,确保洗掉了未结合的染料;在最后清洗后以 1.0 mL 生理盐水重悬,细胞浓度为  $2 \times 10^7$  个/mL。

**1.2.3 大鼠 SCI 模型制备** 47 只成年雌性大鼠随机编号,分为 3 组, A 组为实验组 (SCI + BMSCs 移植,  $n = 15$ ), B 组为对照组 (SCI + 生理盐水,  $n = 16$ ), C 组为假手术组 (假手术 + BMSCs 移植,  $n = 16$ );术前 8 h 禁食、禁水,称重后以 10% 水合氯醛腹腔注射

麻醉 (3 mL/kg), 定位后沿后正中中线切开 3.0 cm 长皮肤,钝性分离筋膜及肌肉,充分暴露 T9-T11 脊椎,咬除 T10 及部分 T9、T11 棘突及椎板,不破坏硬脊膜,暴露该段脊髓组织,用动脉瘤夹夹持脊髓,时间为 1 min;夹持过程中可见大鼠尾巴逐渐卷曲翘起,双后肢出现抽搐,随后尾巴及双后肢松弛瘫软;移除动脉瘤夹后可见 T9-T10 段脊髓明显充血 (图 2), 去除残余的肌肉组织及骨碎片,用生理盐水冲洗伤口,后用庆大霉素冲洗,逐层缝合假手术组仅暴露出脊髓组织,不行动脉瘤夹加持。对实验组和假手术组大鼠尾部用碘伏消毒,1.0 mL 无菌注射器吸取 0.5 mL 上述制备好的骨髓细胞液,缓慢经尾静脉注射,注射时间大于 2 min,对照组注射等量生理盐水。大鼠术中和术后期间体温维持在 37 °C,术后每只鼠分笼饲养,饮用含 500 g/L 庆大霉素水 7 d,防止感染;每日各早晚予以人工膀胱按摩排尿 1 次,直至恢复自主排尿功能。

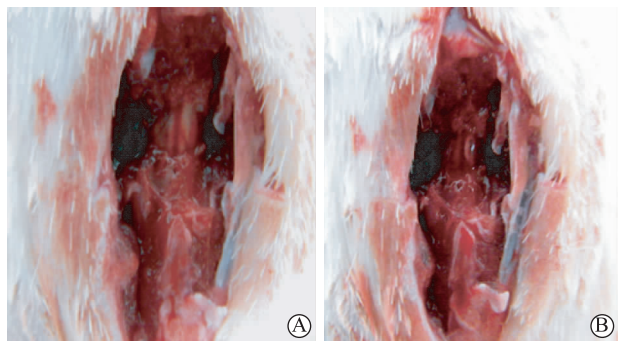


图2 脊髓损伤前后脊髓形态

**1.2.4 运动功能评价 BBB 评分** 大鼠后肢运动功能的恢复通过 BBB (Basso, Beattie, Bresnahan) 评分<sup>[11]</sup>检测,包括 0~21 分,0 分为后肢完全瘫痪,无运动,21 分为完全正常。在术后 1、7、14、21 d,两名对实验双盲的人员观察大鼠后肢运动并记录评分。

**1.2.5 组织病理学检测** 造模 1 d 后分别取对照组和假手术组大鼠各 1 只,以 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉,仰卧位固定,剪开胸骨,暴露心脏,经左心室灌注生理盐水 2000 mL,先快后慢;直至右心耳流出清亮的液体后开始灌注 4% 多聚甲醛 300 mL,前 100 mL 快灌,当出现肌颤后改为慢灌,直至肝脏质地变硬;然后将全部脊髓组织取出,进行拍照;后截取损伤部位上下各 1.0 cm 的脊髓组织,放置于 4% 多聚甲醛溶液中继续后固定 24 h;然后将脊髓组织进行冲洗、脱水、透明、浸蜡、包埋、制成  $4 \mu\text{m}$  切片,

每 10 张取 1 张进行 HE 染色;染色后显微镜下观察脊髓损伤部位的组织形态学变化。

1.2.6 组织免疫荧光染色 剩余大鼠按上述方法处死,取损伤部位上下各 1.0 cm 的脊髓组织放置于 4%多聚甲醛溶液中继续后固定 24 h,继续 30%蔗糖脱水 48 h 以上;在冰冻切片机内 -24℃ 环境下进行 OCT 包埋,行 4  $\mu$ m 厚度的切片;将切片在室温 25℃ 复温 30 min,浸入 4℃ 预冷的丙酮固定 10 min;将切片用 0.01 mol/L 的 PBS 冲洗 3 次,每次 10 min;然后用含 0.25% TritonX-100 的 0.01 mol/L 的 PBS 对组织通透处理 30 min,山羊血清封闭 30 min;去除山羊血清后加入一抗兔抗 GFAP (稀释浓度为 1:400)、Nestin (稀释浓度为 1:200),放置于避光湿盒中 4℃ 过夜;第 2 d 取出湿盒,室温下复温 30 min,0.01 mol/L 的 PBS 冲洗 3 次;加入 Dylight 594 山羊抗兔,抗小鼠荧光二抗,37℃ 孵育 1 h;取出,0.01 mol/L 的 PBS 冲洗 3 次;用 DAPI 染核 10 min,0.01 mol/L 的 PBS 冲洗 3 次,后在蒸馏水中漂洗 1 次;用滤纸吸除多余水分,每张组织切片加入 10  $\mu$ L 抗荧光淬灭封片剂,进行封片;激光共聚焦显微镜下进行观察 PKH67,GFAP,Nestin 阳性细胞分布情况,并拍照。每个组织选不连续 3 张切片进行染色,每张切片随机选取 6 个( $\times 40$  倍)视野进行计数。

1.2.7 统计学处理 采用 GraphPad Prism 5.0 软件,以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。用单因素完全随机方差分析 (ANOVA) 比较各分组的均数,用 Student's t-test 分析多组间两两均数之间差异。

## 2 结果

### 2.1 脊髓组织形态观察

术后 1 d 光镜下可见损伤的脊髓组织结构被破坏,有大量炎性细胞浸润,有较多的空腔形成,神经细胞水肿、坏死 (图 1)。

### 2.2 骨髓间充质干细胞形态观察

培养第 3 d 可见原代培养的骨髓细胞开始贴壁,细胞呈梭形、三角形或多角形外观,杂质较多,换液去除未贴壁的杂质细胞后可见部分细胞形成集落;后每 3~4 d 换 1 次培养液,7~10 d 可见细胞融合达到 80%~90%,呈漩涡状,均匀一致生长;后进行消化传代,传代细胞 24 h 后完全贴壁,生长更加迅速,4 d 左右即可传代,取第 3 代细胞进行染色 (图 3)。

### 2.3 PKH67 标记阳性细胞的检测

PKH67 染料染色后在荧光显微镜下观察,可见 BMSCs 细胞膜在波长为 488 nm 的激发光作用下发出明亮的绿色荧光,表面细胞标记成功 (图 3);移植 21 d 后在共聚焦荧光显微镜下可发现,实验组损伤脊髓组织周围均可见到分布的绿色荧光光点,为 PKH67 阳性细胞 (记为 PKH67<sup>+</sup>),而假手术组没有阳性细胞。

### 2.4 免疫荧光染色观察

术后 21 d 共聚焦荧光显微镜下可见实验组脊髓损伤组织周围 GFAP 阳性和 Nestin 阳性的 PKH67 标记的 BMSCs (记为 GFAP<sup>+</sup>,Nestin<sup>+</sup>),胞膜呈现绿色荧光,胞浆呈现红色荧光,胞核呈现蓝色荧光,共合成后呈现黄绿色荧光 (图 4)。假手术组对应的脊髓组织周围几乎没有 PKH67<sup>+</sup> 细胞 (图 4)。实验组 GFAP 和 Nestin 阳性细胞数较对照组和假手术组明显增加 ( $P < 0.05$ ),对照组较假手术组增加不明显 ( $P > 0.05$ )。

### 2.5 运动功能评价

SCI 术后 1 d 假手术组大鼠四肢恢复活动,但未达正常水平,实验组和对照组大鼠评分均为 0 分,BBB 评分比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。术后 1 周假手术组恢复正常,实验组和对照组 BBB 评分均有增加,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。术后 2、3 周实验组 BBB 评分明显高于对照组 ( $16.0 \pm 1.7$ ,  $9.2 \pm 1.2$ ;  $13.2 \pm 1.8$ ,  $19.0 \pm 1.4$ ;  $P < 0.05$ ) (图 5)。

## 3 讨论

SCI 是一种严重并常见的中枢神经系统疾病,它可直接导致神经损伤,从而引起损伤平面以下感觉及运动功能的丧失,为患者的家庭及整个社会带来沉重的经济负担。SCI 分为原发性损伤阶段 (物理损伤阶段) 和继发性损伤阶段,原发性损伤是脊髓直接受到外力后引起的组织损伤,继发性损伤是原发性损伤后的缺血、炎症、过氧化作用、轴突脱髓鞘、瘢痕形成等过程<sup>[12~13]</sup>。因此,治疗 SCI 的继发性损伤十分重要,目前临床治疗方法包括大剂量激素、手术治疗减轻脊髓压迫、物理治疗及联合治疗,然而这些治疗效果都比较有限<sup>[14]</sup>。近年来,干细胞移植通过减少损伤体积,减轻胶质瘢痕形成,诱导轴突再生等治疗 SCI 已经成为一种新型治疗方法<sup>[15]</sup>。骨髓间充质干细胞又称骨髓基质干细胞,是一类非造血干细胞,具有多向分化潜能,可以分化为脂肪细胞、软骨细胞、成肌细胞等,可作为细胞治疗的来源<sup>[16]</sup>。



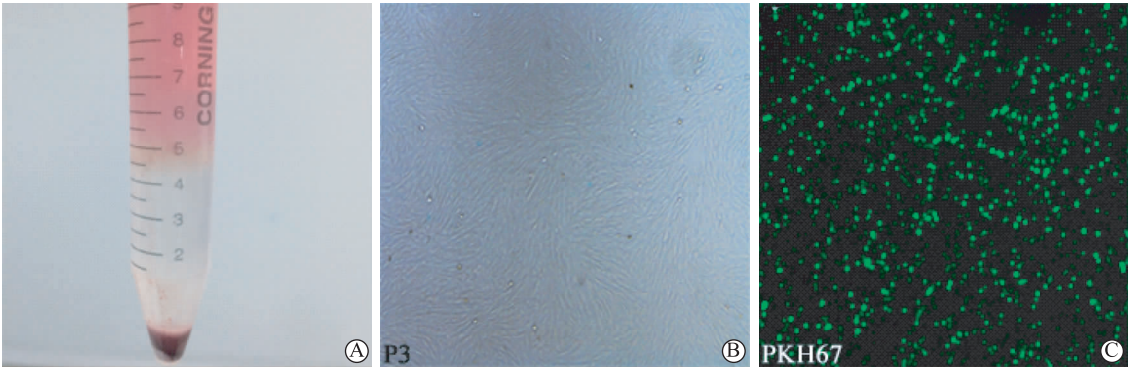


图 3 BMSCs 提取分层,形态及 PKH67 染色(×40 倍)

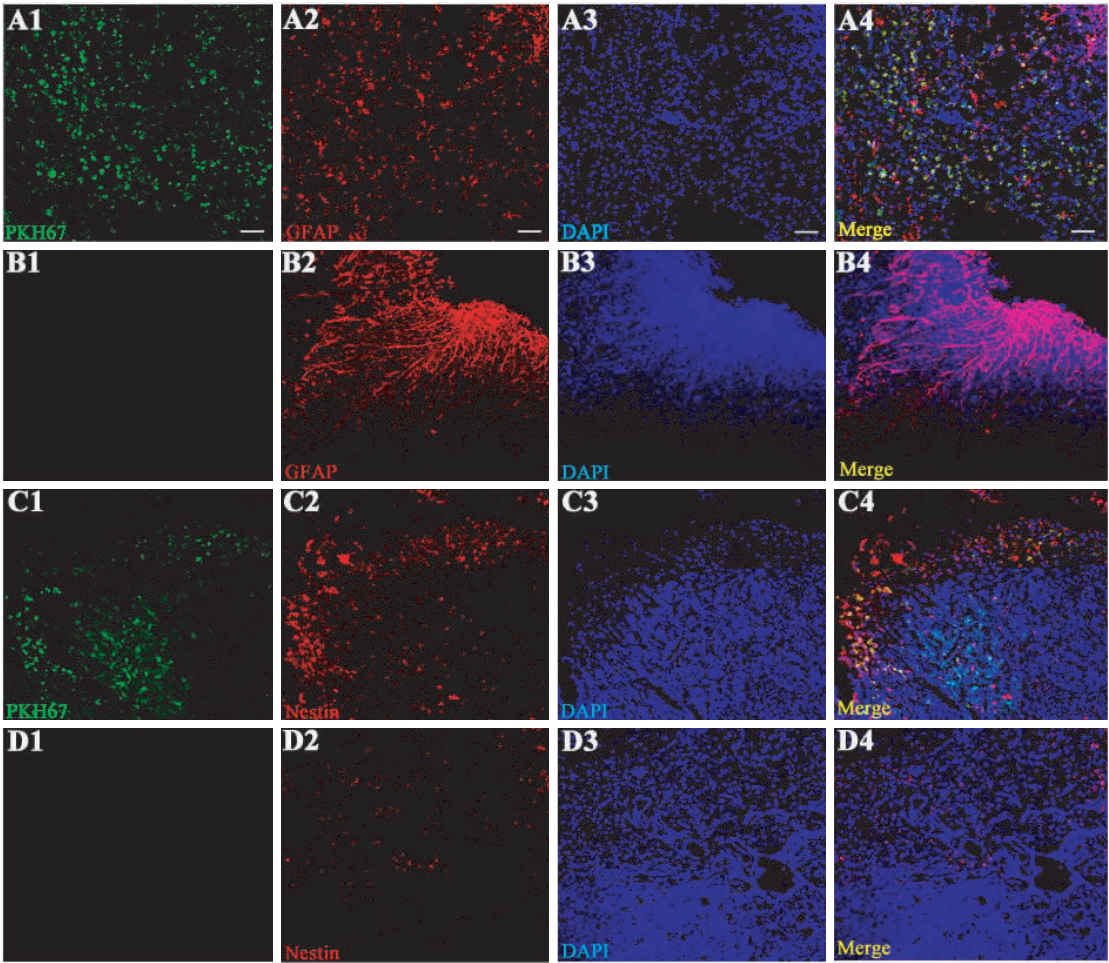


图 4 移植的 BMSCs 在损伤脊髓组织中的检测(×40 倍)

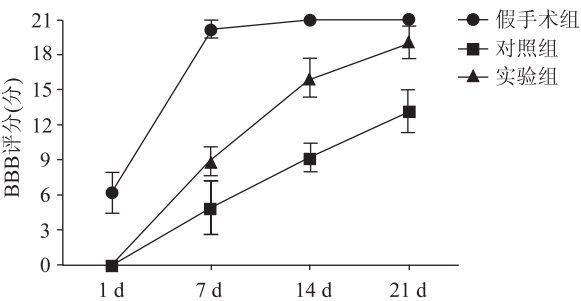


图 5 各组 BBB 评分

因此,BMSCs 移植已经成为近几年治疗 SCI 的研究热点,大量动物实验和临床前期分析证明 BMSCs 能够增加动物 SCI 后修复。然而其治疗 SCI 的机制十分复杂,移植细胞在体内的迁移,增值和分化情况仍在研究中。

在目前研究中有三种主要的脊髓损伤动物模型即脊髓横断模型、脊髓挫伤模型和脊髓压迫模型。本实验采用和人类脊髓损伤发生过程最为接近的脊

髓压迫模型,通过尾静脉移植 PKH67 标记的 BMSCs,来研究它对 SCI 的治疗作用。在术后通过镜下观察损伤部位的脊髓组织来确定造模成功,同时通过 BBB 运动功能评分来评价 BMSCs 的治疗效果。PKH67 是一种通过长脂肪族末端结合细胞膜脂质区的绿色荧光染料,它通过细胞膜上的受体与细胞相连接,减少了染料标记细胞转与非标记细胞的交换。其性质稳定,无细胞毒性,半衰期较长,可在 488 nm 的激发光作用下发出绿色荧光。本实验可观察到 PKH67<sup>+</sup> 的 BMSCs 在大鼠 SCI 模型中存活良好,并可迁移到损伤组织周围,部分分化为神经胶质细胞和类神经元,而未损伤的脊髓组织内几乎没有 PKH67<sup>+</sup> 的 BMSCs 分布。这说明损伤脊髓组织神经元的坏死、炎症介质的释放、损伤微环境的形成都可能刺激外源性移植的 BMSCs 迁移至损伤区域,并诱导其分化为神经元,从而修复神经功能的缺损。动物行为测定也发现,BMSCs 移植的大鼠运动神经功能恢复均好于单纯 SCI 的大鼠。

综上本实验可说明以下几个问题:(1)在脊髓损伤时部分外源性移植的 BMSCs 可以通过血脑屏障到达损伤脊髓组织,本研究推测这可能是由于损伤区的血脑屏障开放,便于 BMSCs 进入脊髓组织;(2)未进入脊髓组织的 BMSCs 可能通过血液进入其他组织器官;(3)通过静脉移植的 BMSCs 能够迁移到损伤脊髓组织中,并分化为类神经元,修复损伤;(4)PKH67 标记 BMSCs 保持了其干细胞生物学特性,是一种,安全、有效、实用的标记方法,可用于干细胞在活体内的示踪。以后,可以进一步研究 BMSCs 除了分化为类神经元外,是否还有通过其他作用如抑制凋亡蛋白表达、分泌神经营养因子等作用共同促进损伤脊髓的恢复,为 BMSCs 在未来临床更大范围的应用上提供有力证据。

### 参 考 文 献

- [1] Liu WG, Wang ZY, Huang ZS. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells expressing the bFGF transgene promote axon regeneration and functional recovery after spinal cord injury in rats[J]. *Neurol Res*, 2011, 33(7): 686-693.
- [2] Silva NA, Sousa N, Reis RL, et al. From basics to clinical: a comprehensive review on spinal cord injury[J]. *Prog Neurobiol*, 2014, 114: 25-57.
- [3] Murray M. Cellular transplants: steps toward restoration of function in spinal injured animals[J]. *Prog Brain Res*, 2004, 143: 133-146.
- [4] Yin F, Guo L, Meng CY, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells exerts anti-apoptotic effects in adult rats after spinal cord ischemia-reperfusion injury[J]. *Brain Res*, 2014, 1561: 1-10.
- [5] Neirinckx V, Agirman G, Coste C, et al. Adult bone marrow mesenchymal and neural crest stem cells are chemoattractive and accelerate motor recovery in a mouse model of spinal cord injury[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2015, 6: 211.
- [6] Jiang PC, Xiong WP, Wang G, et al. A clinical trial report of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in patients with spinal cord injury[J]. *Exp Ther Med*, 2013, 6(1): 140-146.
- [7] Kang ES, Ha KY, Kim YH. Fate of transplanted bone marrow derived mesenchymal stem cells following spinal cord injury in rats by transplantation routes[J]. *J Korean Med Sci*, 2012, 27(6): 586-593.
- [8] Gu W, Zhang F, Xue Q, et al. Transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells reduces lesion volume and induces axonal regrowth of injured spinal cord[J]. *Neuropathology*, 2010, 30(3): 205-217.
- [9] Torres-Espín A, Redondo-Castro E, Hernández J, et al. Bone marrow mesenchymal stromal cells and olfactory ensheathing cells transplantation after spinal cord injury—a morphological and functional comparison in rats[J]. *Eur J Neurosci*, 2014, 39(10): 1704-1717.
- [10] The Ministry of Science, Technology of the People's Republic of China. Guidance suggestions for the care and use of laboratory animals[Z], 2016.
- [11] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats[J]. *J Neurotrauma*, 1995, 12(1): 1-21.
- [12] Yin X, Yin Y, Cao FL, et al. Tanshinone IIA attenuates the inflammatory response and apoptosis after traumatic injury of the spinal cord in adult rats[J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e38381.
- [13] Rowland JW, Hawryluk GW, Kwon B, et al. Current status of acute spinal cord injury pathophysiology and emerging therapies: promise on the horizon[J]. *Neurosurg Focus*, 2008, 25(5): E2.
- [14] Silva NA, Sousa N, Reis RL, et al. From basics to clinical: a comprehensive review on spinal cord injury[J]. *Prog Neurobiol*, 2014, 114: 25-57.
- [15] Gu W, Zhang F, Xue Q, et al. Transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells reduces lesion volume and induces axonal regrowth of injured spinal cord[J]. *Neuropathology*, 2010, 30(3): 205-217.
- [16] Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs[J]. *Exp Hematol*, 1976, 4(5): 267-274.

(2016-04-22 收稿)