

陈爽,谢燕燕,徐菊菊,等.骨髓骨片法体外培养大鼠骨髓间充质干细胞和PKH26标记[J].中国比较医学杂志,2023,33(10):32-37.

Chen S, Xie YY, Xu JJ, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells isolated from rats by bone marrow and slice adherent culture *in vitro* and PKH26 labeling [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(10): 32-37.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.10.005

# 骨髓骨片法体外培养大鼠骨髓间充质干细胞 和 PKH26 标记

陈爽<sup>1</sup>, 谢燕燕<sup>2</sup>, 徐菊菊<sup>1</sup>, 闫振宇<sup>1,2\*</sup>

(1.华北理工大学,河北唐山 063000;2.华北理工大学附属医院,河北唐山 063000)

**【摘要】** 目的 旨在建立一种高效的方法分离和培养大鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)的方法,并应用PKH26进行体外标记,探讨PKH26标记对BMSCs生物学特性的影响,以及体外示踪情况。**方法** 将大鼠5 d乳鼠双后肢骨进行分离,去除周围的肌肉和筋膜,并将其剪成小块进行培养,利用换液、传代提纯BMSCs,应用流式细胞仪测定第3代细胞表面抗原。在培养条件相同的情况下,取第3代BMSCs应用PKH26进行标记,标记组与未标记组在荧光显微镜下对细胞形态学、增殖状态进行观察,比较标记组与未标记组成骨成脂诱导特点及鉴定。**结果** 骨髓骨片法分离乳鼠双后肢骨,培养BMSCs呈细长梭形,形态均一,短时间内可迅速获得大量BMSCs;经流式细胞仪鉴定结果表明,表达CD29为(91.18±1.29)%,表达CD90为(95.04±0.11)%,表达CD45为(1.74±0.36)%;PKH26标记对BMSCs细胞形态、增殖无明显影响( $P>0.05$ ),对成骨成脂诱导无影响。**结论** 采用大鼠5 d乳鼠骨髓骨片法能够快速培养出大量高纯度的BMSCs,该细胞可作为种子细胞用于骨组织工程;PKH26可对体外大鼠BMSCs进行标记。

**【关键词】** 大鼠骨髓间充质干细胞;细胞标记;PKH26;骨组织工程

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 10-0032-06

## Bone marrow mesenchymal stem cells isolated from rats by bone marrow and slice adherent culture *in vitro* and PKH26 labeling

CHEN Shuang<sup>1</sup>, XIE Yanyan<sup>2</sup>, XU Jujun<sup>1</sup>, YAN Zhenyu<sup>1,2\*</sup>

(1. North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, China.

2. the Affiliated Hospital of North China University of Science and Technology, Tangshan 063000)

**【Abstract】 Objective** To establish an efficient method to isolate and culture rat bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) and apply PKH26 to label them *in vitro* to explore the effect of PKH26 labeling on their biological characteristics and achieve *in vitro* tracing. **Methods** Hind limb bones of 5-day-old rats were separated, surrounding muscle and fascia were removed, and the bones were cut into small pieces for culture. BMSCs were purified by fluid exchange and passaging. Cell surface antigens of third passage cells were analyzed by flow cytometry. Under the same culture conditions, third passage BMSCs were labeled with PKH26. Cell morphology and proliferation of labeled and unlabeled groups were observed under a fluorescence microscope. Adipogenic induction characteristics and identification of labeled and unlabeled groups were compared. **Results** The bone marrow slice method was used to separate hind limb

**【基金项目】**河北省自然科学基金面上资助项目(H2019209154);2019年河北省政府资助临床医学优秀人才培养项目。

**【作者简介】**陈爽(1997—),女,硕士研究生,研究方向:血液内科学。E-mail:tydwly@163.com

**【通信作者】**闫振宇(1974—),男,博士,教授,主任医师,研究方向:止血与血栓。E-mail:hbyzy2011@163.com

bones of 5-day-old mice. The BMSC shape was slender, spindle, and uniform. A large number of BMSCs was rapidly obtained in a short time. Flow cytometry showed CD29 expression in  $(91.18 \pm 1.29)\%$  of cells, CD90 expression in  $(95.04 \pm 0.11)\%$  of cells, and CD45 expression in  $(1.74 \pm 0.36)\%$  of cells. PKH26 labeling had no significant effect on the morphology or proliferation of BMSCs ( $P > 0.05$ ) or induction of osteogenesis or adipogenesis. **Conclusions** A large number of high-purity BMSCs was rapidly cultured by the method from 5-day-old rat bone marrow slices, which can be used as seed cells for bone tissue engineering. PKH26 can also label rat BMSCs *in vitro*.

**[Keywords]** rat bone marrow mesenchymal stem cells; cell markers; PKH26; bone tissue engineering

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

骨再生是各种类型的骨创伤研究的难点问题,因为外伤、车祸等外力难以抵抗的因素造成骨损伤、骨缺损,手术治疗是临床唯一有效的彻底治愈手段。但是,由于身体不能耐受手术、置换材料发生排斥反应、手术费用昂贵等因素使其在临床应用上受到一定限制,部分患者常因无法行走而产生心理抑郁。有研究证实,向牵张成骨模型注射自体骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)可以对矿化区形成骨再生<sup>[1]</sup>,并且能够分化为成骨细胞,再通过旁分泌发挥作用,此细胞易分离、扩增、免疫原性低,间充质干细胞提供了骨再生的新方向之一<sup>[2]</sup>。BMSCs 属于修复机体某些特定组织的一类干细胞,是一种能够自我复制和分化为多种细胞类型的祖细胞。另外,多项试验的研究结果证实了 BMSCs 与生物材料具有很好的相容性,形成复合支架促进骨缺损修复、骨组织再生的优势<sup>[3-4]</sup>。近年来, BMSCs 已经成为理想的骨组织工程种子细胞。有实验研究表明,骨髓的收集技术会影响 BMSCs 的异质性,最后影响软骨细胞分化,而对成骨或成骨潜力方面无明显影响<sup>[5]</sup>。本实验中,研究者通过 5 d 大鼠乳鼠骨髓骨片法对 BMSCs 进行分离培养,并作出鉴定。然后应用 PKH26 程序性标记,观察对细胞形态、增殖、诱导分化的影响,为 BMSCs 体内移植到软骨的进一步研究提供了实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

SPF 级 SD 雄性大鼠 5 d 乳鼠和 3~4 周 SD 雄性大鼠分别 2 只,前者体重 11~13 g,后者体重 80~90 g,实验动物均购买于北京华阜康生物科技股份有限公司[SCXK(京)2019-0008]。动物均饲养在华北理工大学医学实验动物中心 SPF 级屏障实验室环境内[SYXK(冀)2020-007],饲养条件:室温 18~26℃,相对湿度 40%~70%。实验动物福利伦理

审查获得华北理工大学伦理委员会批准(2022-SY-012),所有实验动物在实验过程中均遵守 3R 原则。

### 1.2 主要试剂与仪器

$\alpha$ -MEM 培养基、0.25% EDTA 胰酶、双抗(青链霉素)均购买于 Hyclone 公司,货号 SH30265.01、SH30042.01、SV30010;胎牛血清购买于 Gibco 公司,货号 10099-141;PKH26 试剂盒购买于贝博生物科技有限公司,货号 BB-441125;CCK-8 试剂盒购买于北京聚合美生物科技有限公司,货号 MF128-01;油红 O 染色试剂盒、茜素红 S 染色液(0.2%)购买于北京索莱宝科技有限公司,货号为 G1262、G1450;Anti Rat FITC-CD29、Anti Rat FITC-CD90、Anti Rat FITC-CD45 均购买于美国 BD 公司。细胞培养箱购买于美国 Thermo 公司;流式细胞仪购买于美国 Becton Dickinson 公司;荧光倒置相差电子显微镜购买于日本 Nikon 公司;酶标仪购买于美国 Biotek 公司;生物安全柜购买于美国 Farma 公司,型号为 HR60-IIA2;微量电子天平购买于德国 Satorius 公司,型号为 TE601-L。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 大鼠 BMSCs 提取与培养

采用大鼠 5 d 乳鼠骨髓骨片法分离培养大鼠 BMSCs,具体方法为:取 SD 雄性大鼠 5 d 乳鼠 2 只,颈椎脱臼法处死后,用无菌镊子、眼科剪轻轻将其后肢皮肤剥离掉,充分暴露双后肢,分离双侧完整的后肢,去除附着的肌肉和筋膜,用含有 1% 双抗的 PBS 清洗 2 次,并用眼科剪剪成体积小于 3 mm<sup>3</sup> 的小碎块转移至含 10% 血清的  $\alpha$ -MEM 培养基中,混匀后接种在细胞培养瓶中,放置在 37℃ 的 5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中。接种 48 h 后,可观察到骨片周围爬出的是细长的梭形细胞,继续培养至细胞密度达 80% 左右,可进行 1:2 传代,倒置相差显微镜下观察细胞生长情况。

传统大鼠 BMSCs 的分离培养方法是采用 3~4 周 SD 雄性大鼠 2 只,使用 3% 戊巴比妥钠腹腔麻

醉,麻醉剂量 2 mL/kg,然后用 75% 酒精浸泡 10 min,传递至超净台内。取仰卧位,充分暴露膝关节,将后肢皮肤剪开,小心分离股骨胫骨以及肌肉筋膜等,用无菌 PBS 浸泡后,使用 1 mL 注射器冲洗骨髓腔,直至无红色后,收集全部液体,离心,转移到含 10% 血清的  $\alpha$ -MEM 培养基中,混匀后接种在细胞培养瓶中,放置在 37℃ 的 5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中。48 h 后首次换液,继续培养至细胞密度达 80% 左右,可进行 1:2 传代,倒置相差显微镜下观察细胞生长情况。

### 1.3.2 大鼠 BMSCs 鉴定

取第 3 代 BMSCs,对其进行消化、离心、重悬后得到密度为  $1 \times 10^6$ /mL 的单细胞悬液,分别加入抗大鼠单克隆抗体 CD29、CD45、CD90,在 4℃ 下进行 30 min 避光孵育,最后加入 PBS 重悬,上机检测,重复检测 3 次。

### 1.3.3 PKH26 标记大鼠 BMSCs

应用 PKH26 对第 3 代细胞进行染色,配制 PKH26 染色工作液:用无血清  $\alpha$ -MEM 培养基将 PKH26 母液稀释 250 倍后备用。用 100  $\mu$ L 染色工作液将消化完成的细胞沉淀重悬,直至细胞浓度为  $10^7$ /mL,吹打混匀后加到用锡纸包裹的 EP 管中,放入 37℃ 的培养箱进行 10 min 的孵育,4℃ 冰箱中孵育 25 min,800 r/min 离心 5 min,弃上清液,收集细胞,用 PBS 清洗 2 次细胞上未结合的 PKH26 染色液,加入 4 mL 完全培养基重悬细胞,充分吹打混匀,接种在细胞培养瓶中,注意避光,在培养箱内继续培养,传代扩增,随后可以直接在倒置荧光电子显微镜下观察到细胞标记的效果以及荧光的强弱。

### 1.3.4 CCK-8 法检测标记与未标记细胞增殖活力

取第 3 代被 PKH26 标记(实验)组和未被标记 BMSCs(对照)组,制备成单细胞悬液,操作依据 CCK-8 试剂盒检测细胞增殖能力,具体步骤:分别将实验组和对照组的细胞浓度调整为  $2 \times 10^3$ /L,每孔 100  $\mu$ L,接种到 96 孔培养板,设 5 个复孔,在相同条件下培养,每 24 h 分别取 5 个实验组和对照组孔加入 10  $\mu$ L CCK-8 试剂,培养箱中孵育 3 h,在酶标仪 450 nm 参数下读取 OD 值,连续检测 10 d,以培养时间为横坐标,以吸光度为纵坐标,将 PKH26 标记与未标记大鼠 BMSCs 的生长曲线绘制出来。

### 1.3.5 PKH26 标记与未标记细胞成骨成脂诱导及鉴定

(1)细胞成骨诱导及鉴定:成骨诱导液配方为向含 10% 血清的  $\alpha$ -MEM 培养基中加入 10 mmol/L

$\beta$ -甘油磷酸钠、0.05 mmol/L Vc 和 100 mmol/L 地塞米松。取第 3 代细胞调整密度为  $5 \times 10^5$ /孔后,在 6 孔板中接种;当细胞达到 70% 的融合度时,再替换成骨诱导液,培养至第 21 天用茜素红染色。

(2)细胞成脂诱导及鉴定:成脂诱导液配方为向含 10% 血清的  $\alpha$ -MEM 培养基中加入 10  $\mu$ mol/L 胰岛素、1  $\mu$ mol/L 地塞米松、0.5 mmol/L 3-异丁基- $\beta$ -甲基黄嘌呤和 200  $\mu$ mol/L 吡啶美辛。取第 3 代细胞调整密度为  $5 \times 10^5$ /孔后接种于 6 孔板培养;当细胞达到 70% 融合度时,再替换成脂诱导液,培养至第 14 天用油红 O 染色。

## 1.4 统计学方法

所有实验数据采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,用 GraphPad Prism 8 软件进行绘制统计图。计量资料表示为平均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ ),多组数据间差异比较采用单因素方差分析,两组数据之间差异比较采用独立样本 *t* 检验,以  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 细胞的形态观察

将骨髓骨片接种于培养瓶,经过大鼠 BMSCs 原代 36 h 的培养,可见少量从骨片周围爬出,贴壁生长,有大量悬浮的细胞;培养到 72 h,第一次半定量换液,悬浮细胞降低,贴壁细胞逐渐增加,大量细胞爬出,它是细长的梭形、三角形、纺锤形;继续培养到 96 h 以后细胞密集生长,出现大片融合现象,呈漩涡状,可进行 1:2 传代培养。传代到第 3 代细胞均是呈长梭形,形态一致,具有较强的折光性,融合密度较高时可呈漩涡状、鱼群状(图 1)。

传统方法培养的 BMSCs 在 36 h 仅观察到少量细胞贴壁,培养到 48 h 进行首次换液,观察到细胞贴壁数量增加,继续培养到第 72 h,观察到细胞尚未形成群落,排列分散,呈细长梭形;继续培养到 96 h,细胞密度可达 50% 以上,但仍需继续培养,尚无法传代(图 1)。

### 2.2 流式细胞鉴定

如图 2 所示,经流式细胞仪对表面标志物进行检测,第 3 代大鼠 BMSCs 阴性对照为  $(0.55 \pm 0.73)\%$ ,高表达 CD29、CD90,表达量分别为  $(91.18 \pm 1.29)\%$ 、 $(95.04 \pm 0.11)\%$ ,而低表达 CD45,仅有  $(1.74 \pm 0.36)\%$ ,差异显著( $P < 0.001$ ),证明分离培养的是大鼠 BMSC(表 1)。

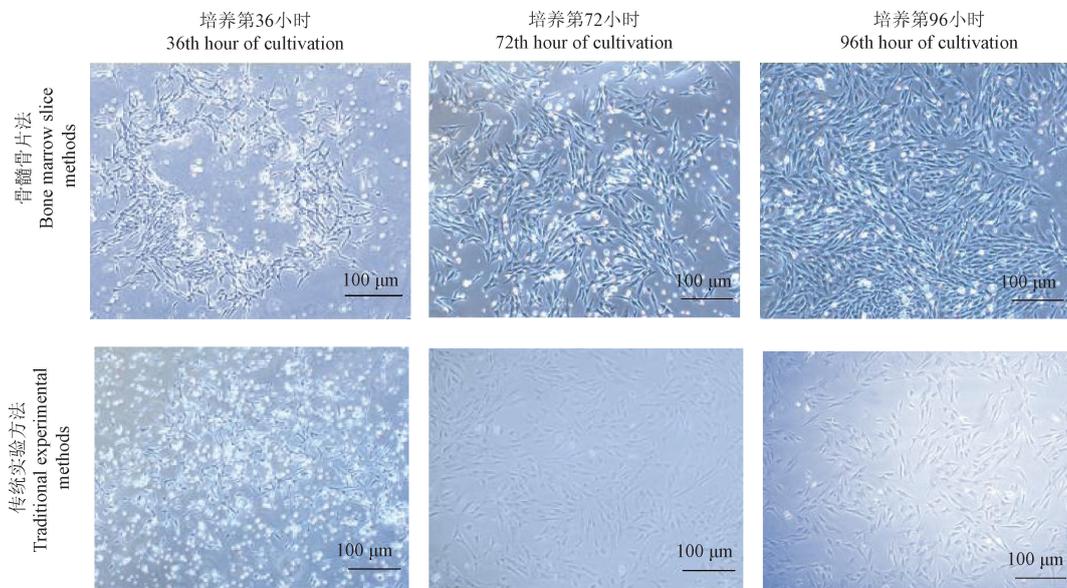


图 1 原代 BMSCs 细胞形态  
Figure 1 Morphology of primary BMSCs

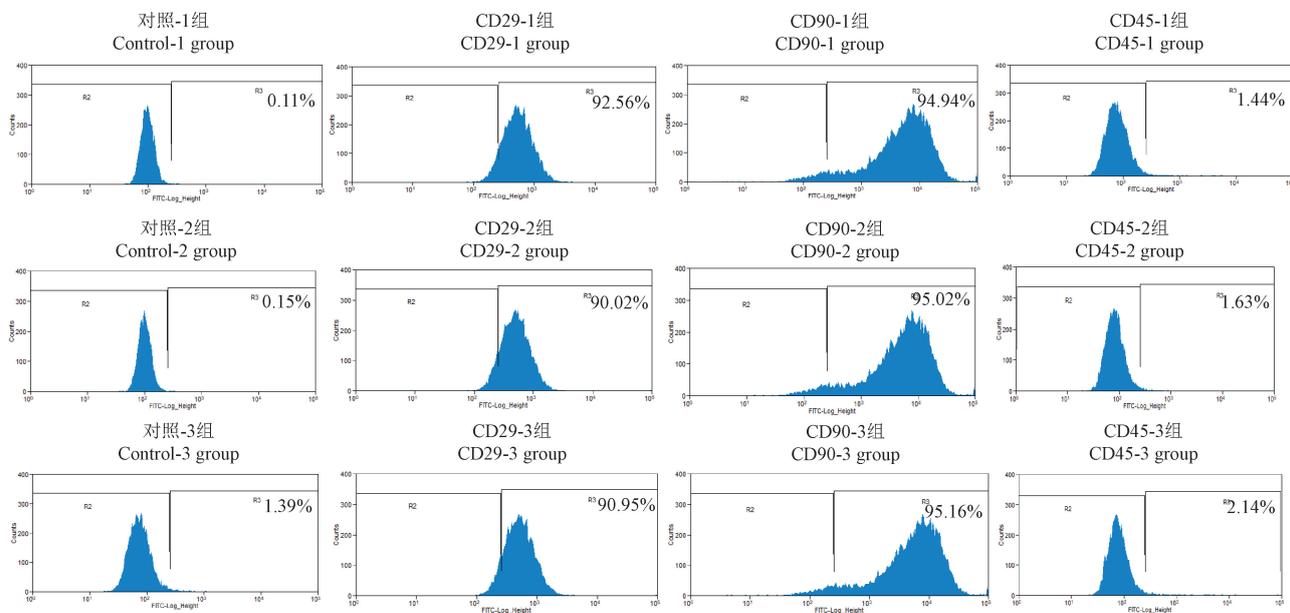


图 2 流式细胞仪检测细胞表面抗原的表达  
Figure 2 Detection of cell surface antigen expression by flow cytometry

### 2.3 PKH26 标记结果

第 3 代细胞经 PKH26 染色 24 h 后,在荧光显微镜下观察呈红色,荧光在细胞膜上分布均匀一致,标记率为 98%,染色前后 BMSCs 细胞形态没有变化(图 3)。

### 2.4 CCK-8 法测定细胞生长曲线

PKH26 标记组与未标记组大鼠 BMSCs 第 2 天缓慢生长,第 3 天加快生长,到第 7 天达到生长增殖高峰期,第 8 天至第 10 天生长进入平台期,大体生

长曲线表现为倒“S”形。两组细胞在 460 nm 处的 OD 值无显著差异 ( $P > 0.05$ ),说明 PKH26 标记 BMSCs 对增殖无显著影响(图 4)。

### 2.5 成骨成脂诱导及染色结果

成骨诱导 21 d 后观察到大量细胞呈絮状,结节状生长,茜素红染色呈红色结节,这种结节就是沉积下来的钙盐;成脂诱导 14 d 后观察到大量细胞内含空泡状透亮圈,具有强折光性,油红 O 染色偏红,是脂滴的形成(图 5)。

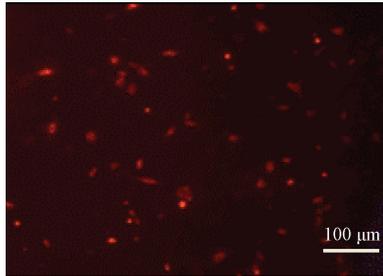
表 1 第 3 代大鼠 BMSCs 表面抗原表达

Table 1 Expression of BMSCs surface antigens in the 3rd generation rats

抗体分类 Antibody classification	表达率(%) Expression rate
对照组 Control group	0.55±0.73
CD29 组 CD29 group	91.18±1.29***
CD90 组 CD90 group	95.04±0.11***
CD45 组 CD45 group	1.74±0.36

注:与对照组比较,\*\*\* $P<0.001$ 。

Note. Compared with the control group, \*\*\* $P<0.001$ .



注:PKH26 标记 BMSCs 24 h 后。

图 3 PKH26 标记结果

Note. 24th hour of PKH26 marking BMSCs.

Figure 3 PKH26 Mark results

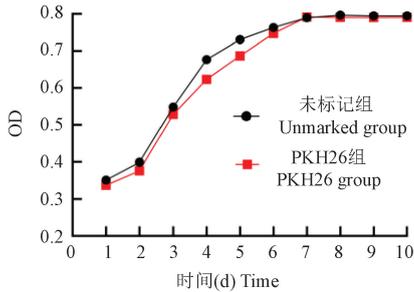
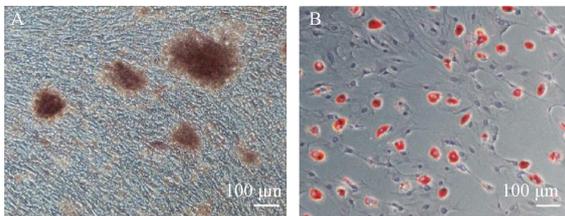


图 4 PKH26 标记组与未标记组生长曲线的比较

Figure 4 Comparison of growth curve between PKH26 labeled group and unlabeled group



注:A:BMSCs 成骨诱导 21 d 后茜素红染色;B:BMSCs 成脂诱导 14 d 后油红 O 染色。

图 5 BMSCs 成骨茜素红染色和成脂油红 O 染色

Note. A, Alizarin red staining 21 days after osteogenesis of BMSCs. B, Oil red O staining after 14 days of lipogenic induction of BMSCs.

Figure 5 BMSCs Alizarin red staining and fatty oil red O staining

### 3 讨论

BMSCs 具有免疫调节、抗炎、抗纤维化等作用,在炎症环境下,关节腔内注射 BMSCs 可能会增加骨异常增殖和异位钙化的风险<sup>[6]</sup>。值得肯定的是, BMSCs 可以代替软骨细胞进行多次扩增,对最终形成的组织几乎没有影响,这使它们成为组织工程中移植细胞来源的主要细胞<sup>[7]</sup>。传统的培养方法如胶原酶消化、贴壁法和差速离心法等可培养 BMSCs<sup>[8-10]</sup>,但短期内大量提取细胞具有一定困难,因此,寻找一种快速高效且稳定的分离纯化途径显得尤为重要。本实验分离培养大鼠 BMSCs 采用大鼠 5 d 乳鼠骨髓骨片法,传代至第 3 代,经流式细胞学鉴定高表达 CD29、CD44、CD90,低表达 CD45,并向成骨、成脂方向诱导,证明该方法可获得纯度较高的大鼠 BMSCs。

近年来发现, BMSCs 已成为细胞移植、组织工程、基因治疗等领域的研究热点。有实验结果证实 BMSCs 移植作为治疗大鼠肺纤维化模型具有前景性的治疗策略,能明显缓解肺泡炎症及肺纤维化<sup>[11]</sup>。同时,脑动脉栓塞大鼠模型进行 BMSCs 移植的实验结果表明, BMSCs 可增加趋化因子和聚唾液酸化酶的表达,增加脑缺血条件下内源性神经祖细胞的迁移,说明该机制可能有助于改善脑缺血<sup>[12]</sup>。另外,间充质干细胞对关节炎的修复作用机制已逐渐变得成熟,有研究表明 BMSCs 可促进软骨修复<sup>[13-14]</sup>。以上这些治疗作用的关键在于移植过程中对细胞进行标记来观察其分化、存活及迁移。常用的标记细胞方法包括 DAPI 标记、BrdU 标记、Dil 标记等,不过,这些荧光染料都有局限性,DAPI 标记是一种标荧光染料,标记细胞核,当标记的细胞死亡后会释放出 DAPI,不需要标记的细胞也会被标记出来,从而引起假阳性,且容易淬灭,不适合用于长期标记<sup>[15]</sup>。BrdU 标记是通过免疫组化的方式进行间接观察,操作不方便,并且标记的细胞死亡后会释放出 BrdU,与 DAPI 类似,同样会造成较高假阳性率<sup>[16]</sup>。Dil 标记细胞 3 d 后会出现严重的细胞毒性反应,35 d 后能被检测到的标记细胞不足 1/2,在体外细胞扩增过程中染色的稳定性低<sup>[17]</sup>。因此,选择一种合适的染料,对大鼠 BMSCs 进行标记、示踪尤为重要。

荧光染料 PKH26 是一种新型染料,用于标记活细胞可以发出强烈稳定的红色荧光。被标记的细

胞与未被标记的细胞相比,形态良好,没有明显的区别,标记率为 98%,这种方法能较好地检测出体外细胞诱导分化的情况,或将标记的细胞注射到动物体内,便于观察活体内移植细胞的迁移情况,从而达到示踪细胞的目的。由于 PKH26 染色方法简便、毒性小,不用放射性同位素,安全系数高。因此,PKH26 是大鼠 BMSCs 的理想标记方式,为小鼠 BMSCs 在体内迁移分化实验的后续研究打下了坚实基础。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Lim HJ, Lee EM, Kim WK, et al. Application of autologous human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in distraction osteogenesis for the treatment of bilateral mandibular hypoplasia [J]. *J Craniofac Surg*, 2018, 29(6): 1629-1632.
- [ 2 ] Fellows CR, Matta C, Zakany R, et al. Adipose, bone marrow and synovial joint-derived mesenchymal stem cells for cartilage repair [J]. *Front Genet*, 2016, 7: 213.
- [ 3 ] Jiao D, Cao L, Liu Y, et al. Synergistic osteogenesis of biocompatible reduced graphene oxide with methyl vanillate in BMSCs [J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2019, 5(4): 1920-1936.
- [ 4 ] Chen Y, Ye SH, Sato H, et al. Hybrid scaffolds of Mg alloy mesh reinforced polymer/extracellular matrix composite for critical-sized calvarial defect reconstruction [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2018, 12(6): 1374-1388.
- [ 5 ] Sivasubramanian K, Ilas DC, Harichandan A, et al. Bone marrow-harvesting technique influences functional heterogeneity of mesenchymal stem/stromal cells and cartilage regeneration [J]. *Am J Sports Med*, 2018, 46(14): 3521-3531.
- [ 6 ] Ding N, Li E, Ouyang X, et al. The therapeutic potential of bone marrow mesenchymal stem cells for articular cartilage regeneration in osteoarthritis [J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2021, 16(7): 840-847.
- [ 7 ] Li X, Wang M, Jing X, et al. Bone marrow-and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells; characterization, differentiation, and applications in cartilage tissue engineering [J]. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2018, 28(4): 285-310.
- [ 8 ] Zhu H, Guo ZK, Jiang XX, et al. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse compact bone [J]. *Nat Protoc*, 2010, 5(3): 550-560.
- [ 9 ] Kitano Y, Radu A, Shaaban A, et al. Selection, enrichment, and culture expansion of murine mesenchymal progenitor cells by retroviral transduction of cycling adherent bone marrow cells [J]. *Exp Hematol*, 2000, 28(12): 1460-1469.
- [ 10 ] 聂文波, 汪明星, 张振华, 等. 密度梯度离心法结合贴壁筛选法分离培养大鼠骨髓间充质干细胞的生物学特性 [J]. *中国继续医学教育*, 2015, 7(21): 69-70.
- [ 11 ] Zhang E, Yang Y, Zhang J, et al. Efficacy of bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in animal models of pulmonary fibrosis after exposure to bleomycin: a meta-analysis [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 17(3): 2247-2255.
- [ 12 ] Shiota Y, Nagai A, Sheikh AM, et al. Transplantation of a bone marrow mesenchymal stem cell line increases neuronal progenitor cell migration in a cerebral ischemia animal model [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 14951.
- [ 13 ] 廖晴, 李保建, 李洋, 等. 低强度脉冲超声介导骨髓间充质干细胞促进膝关节炎软骨修复 [J]. *中国组织工程研究*, 2021, 25(31): 4950-4955.
- [ 14 ] 孙庆云, 闫振宇. 间充质干细胞对骨关节炎修复机制的研究进展及应用 [J]. *中国实验动物学报*, 2021, 29(2): 262-267.
- [ 15 ] Wagers AJ, Sherwood RI, Christensen JL, et al. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells [J]. *Science*, 2002, 297(5590): 2256-2259.
- [ 16 ] Burns TC, Ortiz-González XR, Gutiérrez-Pérez M, et al. Thymidine analogs are transferred from prelabeled donor to host cells in the central nervous system after transplantation; a word of caution [J]. *Stem Cells*, 2006, 24(4): 1121-1127.
- [ 17 ] Froelich K, Steussloff G, Schmidt K, et al. DiI labeling of human adipose-derived stem cells; evaluation of DNA damage, toxicity and functional impairment [J]. *Cells Tissues Organs*, 2013, 197(5): 384-398.

[ 收稿日期 ] 2022-09-21