

骨髓间充质干细胞移植对 VCD 所致卵巢损伤的修复研究 *

王 琰¹ 杨 瑛^{2△} 刘 兵³ 陈宥艺¹ 陈冬波³

(1 第四军医大学唐都医院妇产科 陕西 西安 710038 ; 2 解放军 307 医院妇产科 北京 100071 ;

3 解放军 307 医院肿瘤学研究室 北京 100071)

摘要 目的 :探讨小鼠骨髓间充质干细胞(MSCs)移植对去氧乙烯基环己烯(VCD)所致卵巢早衰治疗的可行性。**方法 :**采用 VCD (160mg kg⁻¹,day⁻¹)连续腹腔注射来诱导小鼠卵巢早衰。每侧卵巢注射转染了绿色荧光基因小鼠骨髓来源的 MSCs ,于移植后 14、28 天及 45 天 ,取各组血液标本及卵巢组织 ,同时观察小鼠动情周期的变化 ,酶联免疫法检测血清 FSH、LH 水平 ,显微镜下观察 MSC 在卵巢的分布。**结果 :**MSCs 移植后各组均可见绿色荧光 ,并且主要分布于卵巢间质区 ,卵巢泡膜细胞区也可见绿色荧光细胞。MSCs 组动情周期较实验对照组缩短 ,FSH 与 LH 水平较实验对照组低 ,差异具有显著性。**结论 :**骨髓间充质干细胞可改善卵巢早衰小鼠的卵巢内分泌功能 ,并且长时间存在于卵巢组织。骨髓间充质干细胞可能成为卵巢早衰治疗的新方法。

关键词 :骨髓间充质干细胞 ;VCD ;卵巢早衰 ;模型 ;小鼠

中图分类号 :R711.75 文献标识码 :A 文章编号 :1673-6273(2011)10-1844-03

Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Transplantation for Premature Ovarian Failure Induced by 4-vinylcyclohexene Diepoxide*

WANG Yan¹, YANG Ying^{2△}, LIU Bing³, CHEN You-yi¹, CHEN Dong-bo³

(1 Department of obstetrics and gynecology,tangdu Hospital ,Forth Military Medical University ,Xi'an 710038 ,China;

2 Department of obstetrics and Gynecology ,307 Hospital of PLA ,Beijing 10071 ,China;

3 Laboratory of oncology ,307Hospital of PLA ,Beijing 10071,China)

ABSTRACT Objective: To investigate the therapeutic potency of MSCs transplantation on premature ovarian failure induced by 4-vinylcyclohexene diepoxide (VCD).**Methods:** Female C57 mice were dosed with VCD (160mg kg⁻¹ day⁻¹, ip) daily to induce ovarian failure. GFP-labeled BMSCs were injected into the ovary. The FSH and LH in the serum were detected and the ovaries were collected at 14d, 28d and 45d after transpantatipn. GFP-labeled MSCs were tracked in the ovaries. Ovarian follicle populations were also determined.**Results:** There were fluorescent cells in ovarian tissues of every time after transplantation. Estrous cycles were shorten in the transplantation group than that in the model group. The FSH and LH in transplantation group at 14, 28, 45days after transplantation were significantly lower than those in the model group. **Conclusions:** The transplantation MSCs can improve the ovary function which damaged by VCD. MSCs can migrate in the mouse ovaries and exist in ovarian tissues of mouse for a long time. MSCs may be a new treatment for premature ovary failure.

Key words: Bone marrow mesenchymal stem cell; VCD; Premature ovarian failure; Model; Mouse

Chinese Library Classification(CLC): R711.75 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)10-1844-03

前言

卵巢早衰(premature ovarian failure,POF)常指女性 40 岁之前出现促性腺激素水平升高、雌激素缺乏、闭经以及不育为特征的疾病。目前已知 POF 的病因有基因、免疫、环境及医源性等因素 ,POF 不仅会引起女性内分泌的紊乱 ,长期还可增加女性骨质疏松、心血管病、阿尔茨海默等疾病的发生率^[1,2] ,危害女性身心健康。骨髓间充质干细胞(bone marrow Mesenchymal stem cell, MSCs)为具有多潜能分化能力的细胞群 ,其不仅具有成骨、软骨、脂肪三系分化能力 ,还具有免疫原性 ,并且能分泌

许多与细胞生长发育相关的因子 ,近年来许多研究发现 MSCs 对神经^[3,4]、心肌^[5,6]、肝^[7,8]、肺^[9,10]、肾^[11,12]等多种组织损伤具有修复功能。本文用环境毒素 VCD 诱导建立小鼠卵巢早衰模型 ,将 MSCs 移植入模型小鼠卵巢 ,观察 MSCs 在卵巢的分布及对卵巢内分泌的影响 ,以期将为 MSCs 用于卵巢早衰治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料与设备

α-MEM(Gibco),胎牛血清(Gibco),VCD(sigma),芝麻油

* 基金项目 国家“863”计划资助子课题(2008AA8070099)

作者简介 王琰(1983-) ,女 ,硕士研究生 ,主要研究方向 :干细胞与组织损伤修复。

电话 :13466796952 Email:wy2005ay@yahoo.com.cn

△通讯作者 杨瑛 ,女 ,硕士生导师 ,教授。Email: yangyin@fmmu.edu.cn

(收稿日期 2011-02-21 接受日期 2011-03-17)

(sigma) ,Ellisa 试剂盒(RD),OP9 细胞(解放军 307 医院肿瘤学研究室提供) ,解剖显微镜(Leica) 荧光显微镜(OLYMPUS)。

1.2 实验动物及分组

SPF 级 C57 雌性小鼠 6 周, 购自军事医学科学院动物中心。将有正常性周期的小鼠纳入实验, 在恒温(22℃) ,光照周期 12h :12h 环境中饲养。随机分为 4 组 ,分别为移植组(A)、模型组(B)、实验对照组(C) ,每组 15 只。将建立的小鼠模型分成 A、B 两组 ,A 组给予细胞移植 ,B 组用 PBS 代替细胞 ,注入方法同 A 组 ,C 组作为模型对照组注射佐剂芝麻油。

1.3 建立卵巢早衰模型

VCD 以 160 mg/Kg 连续腹腔注射 20 天 ,实验对照组给予芝麻油^[1]。于注射第 29 天开始行阴道脱落细胞检查 ,出现 10 天或 10 天以上发情间期 ,视为早衰模型建立。诱导组平均成模时间为 50-70 天 ,于药物注射后第 100 天行细胞移植。

1.4 细胞移植

给药第 100 天时行细胞移植 , 本实验选用 OP9 细胞系 , α -MEM(20% FBS、链霉素、青霉素各 100 U/mL、谷胺酰胺 2mM) 体外扩增培养 ;胰酶消化 , 将 2×10^5 细胞用 5 μ l 含 1% FBS 的 PBS 重悬。0.5 %戊巴比妥麻醉 ,消毒皮肤 ,于小鼠腰背部脊柱两侧切一小口 ,逐层切开皮下脂肪及腹膜 ,暴露卵巢。解剖镜下用细玻璃管(内径约 100 μ m)将细胞悬液注入小鼠双侧卵巢内 ,模型对照组注入等量 PBS ,10 号线缝合皮肤。

1.5 阴道脱落细胞涂片

每天 8-9 点用棉签取小鼠阴道脱落细胞涂片 , 巴氏染色法 ,观察各组小鼠动情周期情况。

1.6 观察卵巢组织结构及 MSCs 分布

取血后脱颈处死小鼠 ,取各组小鼠一侧卵巢 ,4%多聚甲醛固定 ,4℃过度。梯度脱水 ,常规石膜包埋。7 μ m 切片 ,二甲苯脱腊 ,苏木精 - 伊红染色 ,脱水 ,透明 ,中性树脂封片 ,光镜观察卵巢组织结构。卵巢固定后切片 ,荧光显微镜观察 MSCs 分布。

1.7 血清学检测

分别于移植后 14、28 及 45 天摘眼球取血 ,2000 转离心 10 分钟 ,20℃保存。按 Ellisa 试剂盒说明书检测血清 FSH、LH 水平。

1.8 数据统计

使用 SPSS12.0 软件分析。完全随机对照设计统计学法对数据进行分析 , $P<0.05$ 。

2 结果

2.1 动情周期观察

C 组和 D 组阴道脱落细胞涂片检测表现为规律出现动情前期、动情期、动情后期和动情间期 ,C 组动情周期为 3-5 天 ,D 组为 4-6 天。B 组动情周期逐渐延长 ,周期为 10-15 天 ,5 只出现持续动情间期表现。A 组移植细胞后动情周期较 B 组短 ,动情周期 7-10 天。

2.2 卵巢结构及 MSCs 在卵巢的分布

对照组卵巢可见发育中的各级卵泡 ,VCD 诱导组卵巢皮质无明显卵泡结构。MSCs 移植后 14 天即可在 A 组卵巢中观察到有绿色荧光信号 ,并在之后的各观察时间点持续存在(见图 2) ,未移植组无绿色荧光信号。

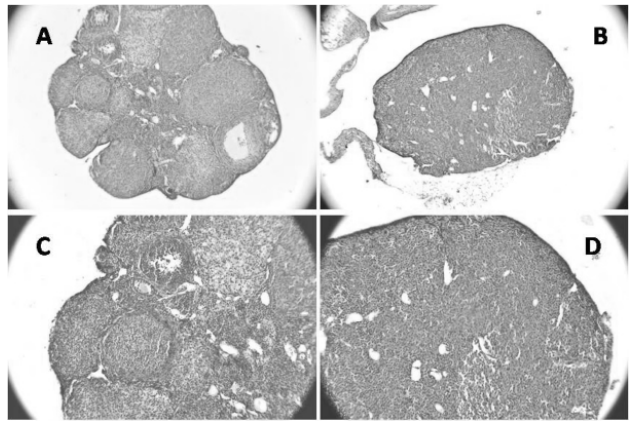


图 1 对照组与 VCD 诱导组卵巢 HE 染色 :A(10 $\times$)和 C(20 $\times$)为对照组 ,B(10 $\times$)D(20 $\times$)为 VCD 诱导组

Fig.1 Imagines of H&E-stained slides were taken to show ovaries from control group(A, C) and VCD-treated group(B, D). Original magnification $\times 10$ (A, B)and $\times 20$ (C, D)



图 2 MSCs 移植后分别于 2w(A),4w(B),6w(C)在移植组小鼠卵巢中可观测到绿色荧光细胞(10 $\times$)

FFig 2 Geen fluorescence could be seen in ovaries under flurescent microscope at different time point,A(2W),B(4W),C(6W),after transplantation.

表 1 MSCs 移植后不同时间点各组血清 FSH 及 LH 浓度

Table 1 Level of FSH and LH among groups at differet time points after MSCs transplantation

Groups		14d	28d	48d
血清 FSH 浓度(IU/L,mean $\pm$ SD,n=5)	C	13.7 $\pm$ 2.10	15.1 $\pm$ 1.67	14.9 $\pm$ 2.01
	B	24.3 $\pm$ 1.85	26.0 $\pm$ 1.36	27.8 $\pm$ 2.07
	A	23.9 $\pm$ 1.85	23.1 $\pm$ 1.55*	21.7 $\pm$ 2.01**
血清 LH 浓度(ng/L,mean $\pm$ SD,n=5)	C	46.4 $\pm$ 10.54	60.5 $\pm$ 9.51	53.8 $\pm$ 10.64
	B	86.2 $\pm$ 7.66	114.3 $\pm$ 7.53	96.7 $\pm$ 9.99
	A	93.2 $\pm$ 10.72	97.7 $\pm$ 8.26*	79.8 $\pm$ 9.58**

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, A vs B

2.3 MSCs 移植对卵巢早衰小鼠血清 FSH 和 LH 的影响

A 组血清 FSH 和 LH 水平于移植后 14 天高于实验对照组和空白对照组, 在之后 28 天和 45 天其水平逐渐降低。模型组对照组 FSH、LH 水平与实验对照组和空白对照组相比逐渐升高(见表 1)。

3 讨论

工业的快速发展为经济进步作出了巨大贡献,同时也带来了环境污染隐患,危及人类身体健康。随着时代的改变,女性在劳动者中所占的比例越来越大,环境污染对女性健康的危害受到人们的关注。POF 为妇科临床常见病,据国外流行病学统计,女性 40 岁前的发病率为 1/100,30 岁之前为 1/1000,20 岁之前为 1/10000^[13],POF 对女性身心健康的影响,在近期可表现为面部潮热、情绪波动、易怒等围绝经期综合征,生育方面表现为闭经、不育^[14,15],远期可出现生殖器官萎缩^[16]、骨质疏松^[17]、心脑血管疾病^[18,19]及肿瘤发生^[20]。对 POF 的治疗主要为外源性激素替代治疗,其对 POF 女性的围绝经症状具有较好改善作用,但也增加了肿瘤发生和发展的潜在危险。

MSCs 是具有多潜能性干细胞,在体内分布广泛,体外易扩增,免疫原性低,特定环境下可诱导分化。起初 MSCs 是作为再生治疗方法用于骨组织损伤修复,最近研究发现其具有调节内源性组织和免疫细胞的功能,目前被临床作为一种新疗法应用于多种组织的损伤修复。将 MSCs 经冠状动脉注入心肌梗死患者体内,能明显改善患者心脏的射血分数^[4],在对多系统萎缩症患者应用冠状动脉输注 MSCs 后,患者神经障碍进展速度减慢^[3],而在干细胞对肝损伤修复的体外研究发现 MSCs 与肝细胞共培养后能够表达肝细胞特异性蛋白^[7],说明 MSCs 在体外能够诱导分化为肝细胞。目前认为 MSCs 对于损伤组织的修复主要通过三种途径:1、定植于受损部位并分化,修复其功能;二、MSCs 本身能够分泌 VEGF、HGF、IGF-1 等多种细胞因子^[21],抑制细胞凋亡;三、通过免疫调节,促进组织的自身修复。有研究显示,静脉给予 MSCs 治疗,其在体内停留的时间很短,注射一周后仅存 1%^[22];而在许多研究中 MSCs 注入后早期即可对靶组织功能起到改善作用,而短期内 MSCs 分化的可能性很小,故多数学者认为 MSCs 对损伤组织的修复在早期可能是通过旁分泌与靶组织相互作用的。

去氧乙烯基环己烯(4-vinylcyclohexene diepoxide,VCD)为 VCH(4-vinylcyclohexene)的代谢产物,是生产橡胶、塑料、杀虫剂、灭火剂等过程中所产生的副产品。以往研究显示 VCD 能够破坏原始及初级卵泡,其机制为加速卵泡自然闭锁进程,随着成熟卵泡的正常排卵,没有新的卵泡募集补充,最终导致雌性小鼠卵巢卵泡耗竭,引起卵巢功能衰竭,长期还可引发卵巢肿瘤^[23,24]。本实验用 VCD 诱导小鼠卵巢功能早衰模型,连续腹腔用药 20 天,45 天起小鼠阴道脱落细胞涂片出现连续 10 天或 10 天以上,平均成模时间为 45-70 天,模型组小鼠卵巢与对照组相比明显缩小,卵巢中各级卵泡数量减少,尤其以原始卵泡及初级卵泡减少显著。MSCs 移植组动情周期较模型组缩短,FSH 及 LH 浓度比未移植组低,移植组内各时间点 FSH 及 LH 浓度比较虽无统计学意义,但呈现逐渐下降趋势,说明 MSCs 移植后不仅能保护损伤的卵巢组织,对残余组织的功能还具有保护作用,对其机制有待进一步研究。

本研究发现,在移植后 15 天、28 天、45 天均可见到绿色荧光细胞,并且移植后的 MSCs 主要分布于卵巢组织的间质部分,卵泡内未见绿色信号,说明 MSCs 能够在受损卵巢中能够存活,血清学检测结果显示,MSCs 移植对 VCD 诱导的卵巢衰竭残余组织功能具有改善作用。体外培养 MSCs 发现其可分泌 VEGF、EGF、HGF 等多种细胞因子,减少细胞凋亡,促进上皮增生,抑制炎症反应^[12]。MSCs 移植对 VCD 诱导的卵巢早衰功能的改善,一方面可能是通过其分泌的细胞因子,抑制卵巢细胞的凋亡,促进分泌类固醇激素细胞的增殖;另一方面可能通过分化为卵巢细胞,促进组织的损伤修复。

骨髓 MSCs 作为组织损伤修复治疗的一种新方法,为临床治疗提供了一条新途径,在心脏和神经损伤修复的临床应用中已取得可喜成果,在卵巢组织修复方面仍处于探索中,本实验证实了 MSCs 能够修复环境毒素对卵巢组织的损伤,对其机制及安全性仍需进一步的研究。

参考文献(References)

- [1] Zelicann R, Patricia JC, Sam LM, et al. Steroidogenic Capacity of Residual Ovarian Tissue in 4-Vinylcyclohexene Diepoxide-Treated Mice [J]. Biol Reprod, 2009,80(2):328-336
- [2] Sherwin B B. Estrogen and cognitive aging in women[J]. Neuroscience, 2006, 138(3): 1021-1026
- [3] Lee PH, Kim JW, Bang OY, et al. Autologous mesenchymal stem cell therapy delays the progression of neurological deficits in patients with multiple system atrophy [J]. Clin. Pharmacol Ther, 2008, 83 (5): 723-730
- [4] Koc O, Day J, Nieder M, et al. Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH)[J]. Bone Marrow Transplant, 2002, 30: 215-222
- [5] Ripa RS, Haack-Sorensen M, Wang Y, et al. Bone marrow derived mesenchymal cell mobilization by granulocyte-colony stimulating factor after acute myocardial infarction:results from the Stem Cells in Myocardial Infarction (STEMMI) trial [J]. Circulation, 2007,116: 124-30
- [6] Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, et al. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction [J]. Nat. Med, 2006, 12:459-465
- [7] Lange C, Bassler P, Lioznov MV, et al. Liver-specific gene expression in mesenchymal stem cells is induced by liver cells[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11: 4497-4504
- [8] Yagi H, Parekkadan B, Suganuma K, et al. Long-term superior performance of a stem cell/hepatocyte device for the treatment of acute liver failure[J]. Tissue Eng. Pt. A, 2009, 15(11): 3377-3388
- [9] Rojas M, Xu J, Woods C, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung [J]. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol, 2005, 33: 145-152
- [10] Ortiz L, Gambelli F, McBride C, et al. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. Proc. Natl[J]. Acad. Sci. USA, 2003, 100: 8407-8411
- [11] Togel F, Hu Z, Weiss K, et al. Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. Am. J. Physiol. Renal Physiol, 2005, 289: F31-42

(下转第 1850 页)

百分比变化做了相关性分析后表明:再灌注 12h、1d、3d、5d、7d 及 14d 大鼠血清 VEGF 表达和凋亡神经元百分比的变化均呈负相关关系($P < 0.05$),脑缺血后 VEGF 表达的增加可能是一种代偿性保护机制,另外有研究证实,VEGF 还可刺激轴索生长,减少缺氧和兴奋性氨基酸所诱导的神经元死亡等直接促神经发生和保护神经元^[10-13]。

本研究中但值得注意的是:VEGF 值在再灌注 12h 时显著提高,说明这可能是微循环重建的一个关键时期,有利于新生血管的形成,从而对改善缺血组织微循环,恢复缺血神经元的血供有重要意义;再灌注 12h 凋亡神经元还没检测到有显著的变化($P > 0.05$),估计由于凋亡的程序性和检测手段的原因,致使检测到的结果具有滞后性,在 1 天后,已经造成显著性神经元凋亡($P < 0.05$),VEGF 对神经元的直接和间接的保护作用是值得肯定的,但是在缺乏外源性干预的情况下,内源性 VEGF 的启动需要复杂的程序与时间,而且含量相对于机体的需要极为有限,所以在缺血再灌注 1 天内开始及时、持续应用外源性 VEGF 来增加再灌注损伤过程中 VEGF 的浓度,从而改善缺血组织微循环,减轻神经元损伤程度,以直接或间接的途径促进神经元修复,可以最大程度的减少脑损伤,但 VEGF 抑制神经元凋亡的相关机制、应用外源性 VEGF 的给药方式、途径及达到梗死灶的最佳时间窗有待进一步深入研究确定。

参考文献(References)

- [1] Obrenovitch TP. Molecular physiology of preconditioning-Induced brain tolerance to ischemia[J]. *Physiol Rev*, 2008, 88(1): 211-247
- [2] 张荣媛,张宏伟,尚爱加.大鼠大脑中动脉缺血再灌注模型制备及行为学评价标准的改进[J].*军医进修学院学报*,2008,10, 29(5):422-423
Zhang Rong-yuan,Zhang Hong-wei,Shang ai-jia.Development of the middle cerebral artery occlusion model and behavioral assessment improvement [J].*Academic Journal of PLA Postgraduate Medical School*, 2008,10, 29(5):422-423
- [3] TIYYAGURA S R, HONEY S P. Left ventricular remodeling after

myocardial infarction: past, present, and future [J]. *Mt Sinai J Med*, 2006 (6):840-851

- [4] Rosenstein JM, Mani N, Khaibulina A, et al. Neurotrophic effects of vascular endothelial growth factor on organotypic cortical explants and primary cortical neuron. *Neurosci*, 2003, 23(25): 11036-11044
- [5] 戴睿,曾秋棠,吴辉文.法舒地尔对急性心肌梗死大鼠心肌的保护作用[J].*临床心血管病杂志*,2008,24(7):537-539
Dai Rui,Zeng Qiu-tang,Wu Hui-wen.Fasudil protects the myocardium in rats with acute myocardial infarction [J]. *Journal of Clinical Cardiology*,2008,24(7):537-539
- [6] Sun Y, Jin K, Xie L, et al. VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *J Clin Invest*, 2003, 111(12): 1843-1851
- [7] Abbate A, Salloum F N, Vecellio E, et al. Anakinra, a recombinant human interleukin 1 receptor antagonist, inhibits apoptosis in experimental acute myocardial infarction[J]. *Circulation*, 2008, 117(20):2670-2683
- [8] Manoonkitiwongsa PS, Schultz RL, McCreery DB, et al. Neuroprotection of ischemic brain by vascular endothelial growth factor is critically dependent on proper dosage and may be compromised by angiogenesis[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2004, 24(6): 693-702
- [9] Tisdall MM, Smith M. Cerebral microdialysis: research technique or clinical tool[J]. *Br J of Anaesthesia*, 2006, 97(1):18-25
- [10] Hillered L, Vespa PM, Hovda DA. Translational neurochemical research in acute human brain injury: the current status and potential future for cerebral microdialysis[J]. *J Neurotrauma*, 2005, 22(1):3-41
- [11] Singhal A, Baker AJ, Hare GMT, et al. Association between cerebrospinal fluid interleukin-6 concentrations and outcome after severe human traumatic brain injury[J]. *J Neurotrauma*, 2002, 19(8): 929-937
- [12] Kalablikis P, Papazoglou K, Gouriotes D, et al. Correlation between serum IL-6 and CRP levels and severity of head injury in children[J]. *Intensive Care Med*, 1999, 25(3): 288-292
- [13] Hattori K, Lee H, Hum PD, et al. Cognitive deficits after focal cerebral ischemia in mice[J]. *Stroke*, 2000, 31: 1939-1944

(上接第 1846 页)

- [12] Tögel F, Weiss K, Yang Y, et al. Vasculotropic, paracrine actions of infused mesenchymal stem cells are important to the recovery from acute kidney injury [J]. *Am. J. Physiol. Renal Physiol*, 2007, 292: F1626-1635
- [13] Coulam CB, Adamson SC, Annegers JF. Incidence of premature Ovarian failure[J]. *Obstet Gynecol*, 1986, 67:604-606
- [14] Kalantaridou SN, Davis SR and Nelson LM. Premature ovarian failure[J]. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 1998, 27:989-1006
- [15] Taylor AE. Systemic adversities of ovarian failure [J]. *Soc Gynecol Invest*, 2001, 8:S7-S9
- [16] Groff A A, Covington S N, Halverson L R, et al. Assessing the emotional needs of women with spontaneous premature ovarian failure[J]. *Fertil Steril*, 2005, 83(6):1734-1741
- [17] Compston JE. Sex steroids and bone [J]. *Physiol Rev*, 2001, 81: 419-447
- [18] Zandi PP, Carlson MC, Plassman BL, et al. Hormone replacement therapy and incidence of Alzheimer's disease in older women: the Cache County Study[J]. *JAMA*, 2002, 288:2123-2129
- [19] Liu Y, Ding J, Bush TL, et al. Relative androgen excess and increased cardiovascular risk after menopause: a hypothesized relation[J]. *Am J Epidemiol* 2001, 154:489-494
- [20] Ovarian cancer. Atlanta: American Cancer Society, 2006 (<http://documents.cancer.org/114.00/114.00.pdf>)
- [21] Dawn B, Bolli R. Adult bone marrow-derived cells: regenerative potential, plasticity, and tissue commitment [J]. *Basic Res Cardiol*, 2005, 100:494-503
- [22] Zangi L, Margalit R, Reich ZS, et al. Direct imaging of immune rejection and memory induction by allogeneic mesenchymal stromal cells [J]. *Stem Cells*, 2009, 27(11):2865-2874
- [23] Anonymous. 4-Vinylcyclohexene [J]. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*, 1994, 60:347-359
- [24] Chan K, Lu R, Chang JC, et al. NRF2, a member of the NFE2 family of transcription factors, is not essential for murine erythropoiesis, growth, and development [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 13943-13948