### 技术与方法

## 应用小动物活体成像追踪观察EGFP 标记的间充质干细胞

王 伟<sup>1#</sup> 陈 超<sup>1#</sup> 刘延明<sup>1</sup> 张 男<sup>1</sup> 吕丽燕<sup>2</sup> 宋现让<sup>2</sup> 韩发彬<sup>1\*</sup> (<sup>1</sup>聊城大学/聊城市人民医院干细胞与再生医学实验室, 聊城 252000; <sup>2</sup>山东省肿瘤医院放射肿瘤重点实验室, 济南 250117)

摘要 为探讨干细胞移植治疗过程中干细胞在体内的存活和迁移能力,利用非细胞损伤性的EGFP(enhanced green fluorescence protein)标记间充质干细胞进行了实验研究。该研究用电穿孔方法将加强的绿色荧光蛋白表达质粒pCMV-EGFP(cytomegalovirus-EGFP plasmid)转染细胞产生具有EGFP标记的牙髓干细胞、皮肤成纤维细胞(skin fibroblast cells, SFCs)和脐带间充质干细胞。将EGFP标记的脐带间充质干细胞注射到裸鼠皮下,用小动物活体成像系统观察了EGFP标记细胞 在体内移植后细胞存活能力和荧光强度随时间的变化情况。结果表明,电穿孔转染能够在体外产 生高效表达EGFP的标记细胞,EGFP在牙髓干细胞、SFCs和脐带间充质干细胞中的表达率分别为 80%、85%和80%。通过小动物活体成像系统检测表明,EGFP标记的脐带间充质干细胞注射到裸 鼠皮下后EGFP荧光表达在7 d后逐渐下降,但免疫组化分析表明,移植细胞可存活6个月以上。该 研究提示,EGFP标记的干细胞可用于体内追踪其存活、迁移及分化,为探讨干细胞移植治疗作用 提供了实验证据。

关键词 牙髓干细胞;皮肤成纤维细胞;脐带间充质干细胞;加强绿色荧光蛋白;体内成像

## Tracking the EGFP-labeled Mesenchymal Stem Cells in Live Animal by *In Vivo* Imaging

Wang Wei<sup>1#</sup>, Chen Chao<sup>1#</sup>, Liu Yanming<sup>1</sup>, Zhang Nan<sup>1</sup>, Lü Liyan<sup>2</sup>, Song Xianrang<sup>2</sup>, Han Fabin<sup>1\*</sup> (<sup>1</sup>Liaocheng University/Liaocheng People's Hospital, Centre for Stem Cells and Regenerative Medicine, Liaocheng 252000, China; <sup>2</sup>Shandong Provincial Key Laboratory of Radio-Oncology, Shandong Cancer Hospital and Institute, Ji'nan 250117, China)

**Abstract** To observe the survival and migration of transplanted stem cell, we developed a non-invasive labeling technique to track the transplanted stem cells *in vivo*. In this study, we transfected the pCMV-EGFP plasmid into cells by electroporation to generate EGFP-labeled-human dental pulp stem cells (DPSCs), skin fibroblast cells (SFCs) and umbilical cord-mesenchymal stem cells (UC-MSCs) *in vitro*, respectively. Then the EGFP-labeled

#共同第一作者

接收日期: 2015-05-11 接受日期: 2016-01-07

山东省科技攻关项目(批准号: 2012GSF11808)资助的课题

<sup>\*</sup>通讯作者。Tel: 0635-8278427, E-mail: fhan2013@126.com

Received: May 11, 2015 Accepted: January 7, 2016

This work was supported by Development Fund of Department of Science and Technology of Shandong Province (Grant No.2012GSF11808)

<sup>&</sup>lt;sup>#</sup>These authors contributed equally to this work

<sup>\*</sup>Corresponding author. Tel: +86-635-8278427, E-mail: fhan2013@126.com

网络出版时间: 2016-02-22 17:10:12 URL: http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160222.1710.012.html

UC-MSCs were injected to the nude mice subcutaneously and were tracked over a period of 5 weeks using IVIS live animal imaging system. It was found that the efficiencies of EGFP transfection are 80%, 85% and 80% in EGFP-labeled DPSCs, EGFP-labeled SFCs and EGFP-labeled UC-MSCs, respectively. Live-animal *in vivo* imaging analysis showed that the EGFP-labeled cells can retain the strong fluorescence for 7 days and decreased eventually overtime, but the immunohistochemistry analysis indicated that transplanted cells could survive for more than 6 months *in vivo*. In conclusion, EGFP-labeled technique could be used as a valuable approach to track the survival and migration of transplanted stem cells *in vivo* for studying the molecular mechanisms of stem cell transplantation.

**Keywords** dental pulp stem cell; skin fibroblast cell; umbilical cord-mesenchymal stem cell; enhanced green fluorescent protein; *in vivo* imaging

自体间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)移植对许多老年退行性疾病和遗传病的细胞 治疗提供了希望。由于细胞移植的途径不同,移植 细胞在体内的迁移和定位也有所差异。因此,对细 胞进行移植后追踪研究有助于了解移植细胞在体内 的存活及分化情况。为了保持标记的细胞具有正 常的生长和功能,一般采用非损伤性细胞标记技术 进行细胞标记。目前对移植细胞进行活体追踪常 用的方法是将表达绿色荧光蛋白(green fluorescence protein, GFP)和冷光素酶(luciferase)报道基因的质粒 转染和标记细胞,进行活体成像追踪分析<sup>[1-3]</sup>。GFP 是用于标记细胞的重要荧光蛋白,对于研究分析细 胞各种蛋白质和细胞器特定基因表达起重要作用, 目前广泛应用于标记肿瘤细胞和干细胞的研究中。

将外源基因表达质粒转入细胞常用的脂质体 法瞬时转染细胞不能产生稳定表达细胞。许多研 究利用慢病毒或逆转病毒载体将表达GFP基因的质 粒转染到细胞,以保持GFP随细胞的分裂而持续表 达GFP<sup>[4-5]</sup>。尽管慢病毒和逆转病毒法提高了转染效 率,但是慢病毒和逆转病毒载体转染细胞的转染效 率及荧光表达强度各不相同[6-7]。电穿孔转染方法 是将细胞暴露在短暂的高场强电脉冲中,从而将外 源质粒转入细胞,其优点是转染效率高。但是一般 情况下,成功的电穿孔过程常伴随高水平的细胞毒 性,因此需要优化最佳电转染条件。研究表明,质粒 的电转染能够直接将外源DNA质粒转入细胞并随 后整合到基因组中, 高效率地表达外源基因[8-9]。许 多实验室利用电转方法将外源基因表达质粒转入细 胞,诱导细胞的重编程产生诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPS)研究其定向分化及移植治 疗作用[10]。

为产生高效率表达GFP的标记细胞, 追踪标记 细胞移植后在体内的迁移、分化及存活能力, 我们 采用电转染方法将pCMV-EGFP质粒转染到牙髓干 细胞(dental pulp stem cells, DPSCs)、皮肤成纤维细 胞(skin fibroblast cells, SFCs)及脐带间充质干细胞 (umbilical cord-mesenchymal stem cells, UC-MSCs) 中, 分析EGFP在不同细胞的表达情况, 并将EGFP标 记的UC-MSCs移植到小鼠体内用活体动物成像系 统对标记细胞进行追踪分析, 以便为探讨干细胞的 移植治疗作用提供实验依据。

#### 1 材料与方法

#### 1.1 细胞分离培养与试剂

实验中人牙髓干细胞取自成人第三磨牙牙髓, 皮肤成纤维细胞取自正常成人皮肤组织,脐带间充 质干细胞取自新生儿脐带组织。细胞分离采用我 们实验室以前报道的方法进行<sup>[11-12]</sup>,其简要步骤如 下:无菌采集新鲜的牙髓组织或直径为3~5 mm皮肤 组织块,或2~3 cm的新生儿脐带组织,在生物安全柜 中用PBS冲洗3次,置于60 mm培养皿中并加入少量 DMEM培养液保持组织湿润,将其剪成组织碎块,然 后在37 °C、5% CO<sub>2</sub>条件下培养,细胞培养基含有 80% DMEM、20% FBS、1% L-谷氨酰胺、1%非必 需氨基酸(NEAA)及1% P/S(青霉素/链霉素)。组织 培养大约10~14 d后有细胞从组织块中爬出,细胞密 度达到80%~90%后,用TrypLE在37 °C消化处理原代 培养细胞,按1:3比例传代,在37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养箱 中培养,每3~4 d更换培养基1次。

细胞培养试剂: TrypLE、Opti-MEM购置美国 Invitrogen公司; pCMV-EGFP质粒DNA购自日本 Nepa Gene公司; 基因电转采用NEPA21电转染系统 (日本Nepa Gene公司)。

#### 1.2 体外培养细胞电转染

分离的人牙髓干细胞、皮肤成纤维细胞和脐 带间充质干细胞在37°C、5% CO<sub>2</sub>条件下培养传代 后,取对数生长期的细胞(细胞密度70%~80%)进行 质粒电转染。电转前用TrypLE消化、收集细胞,用 Opti-MEM培养液洗涤重悬细胞,去除残留的血清 及P/S,将细胞密度调整到10<sup>4</sup>/μL体系,加入pCMV-EGFP质粒混匀,分装到电转杯中。每个电转杯(内 径2 mm)反应体积为100 µL, 含10<sup>6</sup>细胞和10 µg质 粒。按照电转仪对不同细胞优化的电转程序设置 不同的电压,脉冲时间、脉冲次数及电压衰减率等 条件, 测定体系的电阻值, 进行电转染。电转后立 即将细胞转移到6孔板中,加入含10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的培养基于37°C、5% CO2培养 箱中继续培养。1 d后观察EGFP绿色荧光表达情况, 计算细胞的转染效率,并用倒置荧光显微镜拍照采 集图像(Nikon eclipse-Ti, 日本Nikon公司)。

#### 1.3 利用EGFP表达质粒转染UC-MSCs进行体内 移植细胞追踪

利用TrypLE消化培养的脐带间充质干细胞, 取1×10<sup>6</sup>个UC-MSCs, 重悬于100 μL电转液中, 加入 10 μg pCMV-EGFP质粒, 在电转仪上以150 V、5 ms 条件电转染UC-MSCs, 然后在T75培养瓶中培养扩 增, 产生EGFP标记的UC-MSCs。当细胞密度达到 90%左右, 利用TrypLE消化、收集细胞, 重悬于PBS 中待用。

选取体重20~25 g裸鼠,腹腔注射10%水合 氯醛(3 mL/kg)进行麻醉。待裸鼠麻醉后,分别选 取右腋下和右髂部皮下注射PBS和30 µL UC-MSC-EGFP(3×10<sup>6</sup>个细胞),然后转移至小动物活体成像 系统观察荧光表达情况[小动物成像系统采用IVIS 200 Imaging Systems(美国Xenogen Corporation公司, Alameda, CA)]。

# **1.4** 免疫荧光组织化学染色(immunofluorescence histochemistry)

对移植EGFP标记细胞的小鼠用活体成像系统 连续采集图像5周后,继续观察6个月,然后颈椎脱臼 处死小鼠,分离移植的细胞组织,用4%多聚甲醛固定 15 min, PBS冲洗3次。加入封闭液(1×PBS中添加10% 羊血清NGS、0.2% Triton X-100)室温封闭1 h。然后 加入CD44一抗抗体(1:250稀释)、4 °C孵育24 h, 然后 PBS冲洗3次。再加入荧光标记的二抗抗体, 37 °C孵 育12 h, PBS洗3次。用Hoechst 33258(1:10 000)染细 胞核5 min, 在荧光显微镜下观察分析。

#### 2 结果

#### 2.1 牙髓干细胞体外转染结果

为了获得最大转染效率和最小的细胞死亡率,我们选择不同电转条件将pCMV-EGFP质粒转染DPSCs。然后在不同电压和作用时间进行转染DPSCs,电转后约24 h用荧光显微镜观察EGFP表达情况,图1为在4组不同电转条件(120 V、5 ms; 130 V、7.5 ms; 150 V、5 ms; 225 V、2.5 ms)下获得的转染效率。不同转染条件获得的GFP转染效率见图1F。

通过细胞计数分析表明,4组电转条件的细胞 转染效率分别为50%、70%、80%、80%。随着电 压升高,电转染效率升高,但细胞存活率随之下降。 结果发现,150 V、5 ms条件转染效果最好,转染效 率可达到80%左右,细胞存活率也在85%以上,细胞 形态正常,生长状态良好。

#### 2.2 皮肤成纤维细胞体外转染结果

根据DPSCs在不同电转条件下的转染效果, 我 们选择DPSCs转染效率最高的150 V、5 ms条件将 pCMV-EGFP质粒转染SFCs。按照电转仪器推荐的 程序设置与DPSCs同样的电转条件。电转24 h后, 用 荧光显微镜观察EGFP表达情况(图1E)。经计数发现, 细胞转染效率可达85%以上, 细胞存活率也可达到 80%以上, 细胞生长状态良好。

#### 2.3 脐带间充质干细胞体外转染效果

将培养的UC-MSCs进行流式细胞分析表明,其 表达CD73和CD90分别为93.4%和99.9%(图2A),与 SFCs、骨髓间充质干细胞及牙髓间充质干细胞表 面标志物表达相似<sup>19]</sup>。我们用EGFP表达质粒转染体 外培养的UC-MSCs产生EGFP标记细胞,结果发现, EGFP的转染效率在80%以上(图2B)。

#### 2.4 EGFP标记的UC-MSCs体内移植追踪

在体外用EGFP表达质粒转染细胞确定细胞内 EGFP表达后,我们将EGFP转染的UC-MSCs细胞注射 到裸鼠皮下了解细胞的存活及荧光强度变化。为确 定小动物成像系统能够检测到移植细胞的EGFP荧光 强度,我们根据文献报道选用不同浓度的细胞先在 体外进行测试。结果发现,含有20 μL(1×10<sup>5</sup>/μL)标记 细胞的EP管能够明显检测到荧光(图3A,左侧EP管),



DPSCs在120 V、5 ms(A), 130 V、7.5 ms(B), 150 V、5 ms(C), 225 V、2.5 ms(D)和SFCs在150 V、5 ms(E)电穿孔条件下的EGFP转染效果。在 不同电转条件下转染DPSCs细胞产生的EGFP转染效率(F)。1:120 V、5 ms; 2:130 V、7.5 ms; 3:150 V、5 ms; 4:225 V、2.5 ms. 5: SFCs在150 V、 5 ms条件下产生的EGFP转染效率。

EGFP transfection efficiency in DPSCs at electroporation condition of 120 V, 5 ms (A); 130 V, 7.5 ms (B); 150 V, 5 ms (C); 225 V, 2.5 ms (D); EGFP transfection efficiency in SFCs at 150 V, 5 ms (E). The transfection efficiencies of EGFP plasmid in DPSCs at different electroporation conditions (F), 1: 120 V, 5 ms; 2: 130 V, 7.5 ms; 3: 150 V, 5 ms; 4: 225 V, 2.5 ms. 5: the transfection efficiencies of EGFP plasmid in SFCs at 150 V, 5 ms.







A: 流式细胞术分析CD73、CD90和CD34在UC-MSCs表达; B: 转染EGFP质粒至UC-MSCs的效率。

A: analysis of CD73, CD90, CD34 expression in UC-MSCs by flow-cytometry; B: efficiency of pCMV-EGFP plasmid transfection in UC-MSCs.

图2 EGFP标记脐带间充质干细胞(UC-MSCs)

Fig.2 EGFP-labeled umbilical cord-mesenchymal stem cells



A: 活体动物成像系统检测不同数量EGFP标记的MSCs细胞产生的荧光强度(黄色亮点), 左侧管表示移植2×10<sup>6</sup>细胞, 中间管表示1×10<sup>6</sup>细胞, 右 侧管表示PBS对照; B: 小鼠俯卧位检测腹部移植EGFP标记细胞; C: 小鼠侧卧位检测腹部移植EGFP标记细胞(黄色亮点)。 A: the fluorescence of EGFP-expressing MSCs *in vivo* by live animal imaging analysis; B: fluorescence detection of EGFP-labeled cells in nude mouse posted in lateral position.

图3 EGFP标记脐带间充质干细胞的裸鼠体内追踪

Fig.3 In vivo tracking of EGFP-labeled umbilical cord-mesenchymal stem cells in nude mice

含有10 μL细胞的EP管(图3A,中间管)及PBS对照EP 管(图3A,右侧管)不能检测到荧光。为了保证移植 细胞的荧光强度便于追踪,我们取30 μL EGFP标记 细胞注射到裸鼠腹部皮下,结果发现小鼠在俯卧位 时看到较弱的EGFP荧光(图3B),小鼠在侧卧位能够 观察到明显的EGFP荧光(图3C)。

为进一步了解EGFP标记的细胞荧光强度随时 间变化情况,我们将30 µL(1×10<sup>5</sup>/µL)EGFP标记UC-MSCs进行小鼠腹部皮下注射,分别在细胞移植0、1、 2、3、4和5周后在小动物活体成像系统观察。结果 发现,标记的细胞在移植后的第1周荧光强度达到最 高峰,在第2周以后荧光强度减弱并逐渐消失(图4A~ 图4F)。标记细胞荧光强度随时间变化曲线如图4H。 同时我们发现,移植EGFP标记细胞的局部区域在5 周后仍然存在细胞团块(图4G),提示移植的细胞可 能仍然存活。

由于活体动物成像表明,EGFP标记移植细胞的 荧光在1周后逐渐下降,其原因可能是,细胞EGFP表 达逐渐降低或者是部分移植细胞死亡造成。为了解 荧光强度随时间变化情况,我们一方面重新用EGFP 表达质粒标记UC-MSCs细胞进行体外培养,并在质 粒转染后的不同时间进行EGFP表达细胞的计数分 析(35 d)。结果发现,标记细胞荧光强度在第7 d达到 最高,然后逐渐下降,标记细胞可以长期存活5周以 上(图5A和图5B),此结果与活体动物成像荧光检测 相一致。另一方面,将移植6个月后的细胞团进行 分离、固定、切片和免疫组化分析,结果发现,移 植的EGFP标记细胞仍然表达人源性间充质干细胞 表面标志物CD44,表明部分移植的细胞能够存活6 个月以上(图5C)。此结果进一步表明,荧光强度减 弱的部分原因是由于细胞表达EGFP逐渐减弱。

#### 3 讨论

间充质干细胞是机体内具有多向分化能力的 干细胞并用于许多疾病的治疗研究,如骨髓间充质 干细胞(bone marrow-mesenchymal stem cells, BM-MSCs)、牙髓间充质干细胞,脐带间充质干细胞(UC-MSCs)和SFCs等<sup>[13-14]</sup>。有研究报道, DPSCs和脐带间 充质干细胞具有成骨分化和成神经分化能力。对利 用DPSCs和脐带间充质干细胞再生修复骨组织和神



EGFP标记细胞移植不同周后的活体动物成像荧光变化。0周(A)、1周(B)、2周(C)、3周(D)、4周(E)、5周(F); 右侧皮下注射移植3×10<sup>4</sup>标记细胞形成的细胞团保持5周以上(G), 箭头指示注射的细胞团块, 三角号指示注射的PBS对照; 标记细胞的EGFP荧光强度随时间变化曲线(H)。 The fluorescence variation of the EGFP-labeled cells at different week(s). 0 w (A), 1 w (B), 2 w (C), 3 w (D), 4 w (E) and 5 w (F) after transplantation; The cell clump formed by injection of 3×10<sup>5</sup> (30 μL) EGFP-labeled cells lasted for 5 weeks after transplantation (G); The fluorescence variation curve of the EGFP-labeled cells at different times after transplantation (H).





A: pCMV-EGFP质粒转染脐带间充质干细胞表达EGFP随时间降低; B: EGFP标记脐带间充质干细胞在转染后不同时间的表达率(1、3、7、14、21、28、35 d); C: EGFP标记细胞体内移植6个月后广泛表达CD44。

A: the decrease of fluorescence in the in EGFP-labeled UC-MSCs with the increase of time; B: the EGFP expression efficiencies of EGFP-labeled UC-MSCs at different times after transfection (1, 3, 7, 14, 21, 28, 35 d); C: CD44 is widely expressed in transplanted EGFP-labeled 6 months after transplantation.

图5 EGFP标记脐带间充质干细胞在体外EGFP表达变化和体内移植后细胞长期存活情况 Fig.5 In vitro EGFP expression and in vivo long-term survival of EGFP-labeled-umbilical cord-mesenchymal stem cells in the nude mice 经损伤具有重要的意义<sup>[13-15]</sup>。干细胞移植治疗需要 对移植细胞在体内的迁移和定位有所了解,以便提 高细胞治疗的效果并探讨其作用机制。因此,选择 合适的荧光或冷光标记移植的细胞,从而用活体动 物成像系统进行追踪<sup>[6-7]</sup>。

本研究发现,将pCMV-EGFP质粒转染到不同的 间充质干细胞,在合适的电转条件下,都可产生80% 以上的转染效率。因此,我们选择EGFP转染的脐带 间充质干细胞注射到小鼠体内,发现EGFP标记的细 胞在活体内能够高强度的表达EGFP持续1周以上, 表明电转EGFP质粒标记干细胞能够用于短时间追 踪细胞在体内的迁移情况。此外,我们发现移植的 细胞能够存活6个月以上并且广泛表达间充质干细 胞表面标志物CD44,表明移植的细胞可以在体内长 期存活,提示细胞移植能够长期发挥治疗作用。同 时,我们发现细胞移植6个月以后仍然聚集在局部移 植部位, 而没有向周围迁移的迹象, 提示移植细胞迁 移到体内其他部位的可能性较小。但是,此研究没 有对移植EGFP标记细胞的体内分化情况进行分析、 在今后的研究中将以此为依据设计全面分析干细胞 移植后的体内分化研究,以便为干细胞的临床应用 提供可靠的实验依据。胡运生等[16]用绿色荧光蛋白 标记兔的骨髓间充质干细胞并移植到兔皮下,通过 荧光聚焦显微镜追踪和观察观察间充质干细胞的成 骨分化能力,发现骨髓间充质干细胞能分化成骨组 织细胞,但仅仅追踪移植细胞4周后的分化情况。本 文是进行移植细胞的活体追踪和细胞存活的长期研 究。所得结果清楚地表明, EGFP转染的间充质干细 胞在体内能够存活6个月以上,提示移植的干细胞可 以在体内长期存活,并且可诱导分化成相应的组织 细胞发挥临床治疗作用。

我们进行EGFP标记细胞的体内追踪研究发现, EGFP标记的细胞在体内和体外绿色荧光表达持续 7~10 d, 然后EGFP的表达随时间延长逐渐下降。这 可能是由于几方面的原因引起的。一方面, 转染的 pCMV-EGFP质粒使用CMV启动子, 该启动子在哺 乳动物中驱动基因表达, 受到细胞内多种因素的影 响而导致EGFP表达逐渐下降, 因此在今后的实验中 可以考虑选用调节基因持续表达的启动子, 如EF1a 等; 另一方面, pCMV-EGFP质粒整合进细胞基因组 中的效率比较低, 在细胞分裂的过程中存在丢失现 象, 造成细胞表达EGFP随时间减弱; 此外细胞移植 后可能有部分细胞死亡,GFP标记的存活细胞总数减少也会造成体内EGFP荧光强度降低。

本研究用电转染方法将pCMV-EGFP质粒转染 到不同间充质干细胞能够产生80%以上的转染效率, 因此不需要采取分选的方法纯化EGFP标记的细胞, 即可进行移植后的活体追踪,避免了细胞纯化过程 引起的细胞损害。利用电转染表达EGFP标记干细 胞能够对干细胞移植后的体内分化进行追踪分析, 寻找提高干细胞移植效果的细胞移植方式和确定细 胞移植数量提供实验依据,指导临床细胞治疗措施 的制定。

#### 致谢-----

此研究得到山东省科技攻关项目资助(项目编 号:2012GSF11808)。感谢广州华粤行仪器有限公司 梁雪的技术支持。

#### 参考文献 (References)

- 1 Xie Y, Yin T, Wiegraebe W, He XC, Miller D, Stark D, *et al.* Detection of functional haematopoietic stem cell niche using real-time imaging. Nature 2009; 457(7225): 97-101.
- Kim JE, Kalimuthu S, Ahn BC. *In vivo* cell tracking with bioluminescence imaging. Nucl Med Mol Imaging 2015; 49(1): 3-10.
- 3 Czernik M, Fidanza A, Sardi M, Galli C, Brunetti D, Malatesta D, et al. Differentiation potential and GFP labeling of sheep bone marrow-derived mesenchymal stem cells. J Cell Biochem 2013; 114(1): 134-43.
- 4 Wilson K, Yu J, Lee A, Wu JC. *In vitro* and *in vivo* bioluminescence reporter gene imaging of human embryonic stem cells. J Vis Exp 2008; doi: 10.3791/740.
- 5 袁 捷, 刘德莉, 周广东, 苗春雷, 崔 磊, 刘 伟, 等. 应用GFP标 记技术示踪裸鼠体内组织工程化骨的形成. 上海第二医科大 学学报(Yuan Jie, Liu Deli, Zhou Guangdong, Miao Chunlei, Cui Lei, Liu Wei, *et al.* Use of GFP labelling technique to monitor tissue engineere bone formation in nude mice. Academic Journal of Shanghai Second Medical University) 2004; 24(4): 235-37, 66.
- 6 Zhao Y, Bower AJ, Graf BW, Boppart MD, Boppart SA. Imaging and tracking of bone marrow-derived immune and stem cells. Methods Mol Biol 2013; 1052: 57-76.
- 7 Miyata S, Komatsu Y, Yoshimura Y, Taya C, and Kitagawa H. Persistent cortical plasticity by upregulation of chondroitin 6-sulfation. Nat Neurosci 2012; 15(3): 414-22, S1-2.
- 8 Chen J, Sai SY, Vazin T, Coggiano M, Freed WJ. Human embryonic stem cells which express hrGFP in the undifferentiated state and during dopaminergic differentiation. Restor Neurol Neurosci 2009; 27(4): 359-70.
- 9 Yamano T, Iguchi H, and Fukuzawa H. Rapid transformation of Chlamydomonas reinhardtii without cell-wall removal. J Biosci

- 10 韩发彬. 诱导多能干细胞及其在神经退行性疾病研究中的应用. 中国细胞生物学学报(Han Fabin. The applications of the induced pluripotent stem cells in studying the neurodegenerative diseases. Chinese Journal of Cell Biology) 2012; 34(5): 6-17.
- 11 张 男, 王 伟, 陈保兴, 陈 超, 贾 昕, 丁字欣, 等. 人体牙髓干 细胞的分离与鉴定. 中华细胞与干细胞杂志(电子版)(Zhang Nan, Wang Wei, Chen Baoxing, Jia Xin, Ding Yuxin, *et al.* Isolation and characterization of human dental pulp stem cells. Chin J Cell Stem Cell, Electronic Edition) 2014; 4(3): 183-8.
- 12 Han F, Wang W, Chen B, Chen C, Li S, Lu X, *et al.* Human induced pluripotent stem cell-derived neurons improve motor asymmetry in a 6-hydroxydopamine-induced rat model of Parkinson's disease. Cytotherapy 2015; 17(5): 665-79.
- 13 Cui X, Chen L, Xue T, Yu J, Liu J, Ji Y, *et al*. Human umbilical cord and dental pulp-derived mesenchymal stem cells: biological characteristics and potential roles *in vitro* and *in vivo*. Mol Med

Rep 2015; 11(5): 3269-78.

- 14 Kawashima N. Characterisation of dental pulp stem cells: A new horizon for tissue regeneration? Arch Oral Biol 2012; 57(11): 1439-58.
- 15 邹西峰, 赵春礼, 张海燕, 李铁林, 徐群渊. 应用逆转录病毒 pLXSN-GFP在脑组织追踪骨髓源干细胞的可行性. 中华神经 医学杂志(Zou Xifeng, Zhao Chunli, Zhang Haiyan, Li Tielin, Xu Qunyuan. Feasibility of tracing the bone marrow-derived stem cells in brain tissue with retrovirus pLXSN-GFP. Chin J Neuromed) 2004; 3(5): 327-9.
- 16 胡运生, 马保安, 李文海, 张 勇, 范清宇. 绿色荧光蛋白标记 基因体内示踪骨髓间充质干细胞的分化. 中国修复重建外 科杂志(Hu Yunsheng, Ma Baoan, Li Wenhai, Zhang Yong, Fan Qingyu. Green fluorescent protein labeling gene transferred into mesenchymal stem cells to trace their differentiation *in vivo*. Chinese Journal of Reparative and Reconstructive Surgery) 2007; 21(6): 633-7.