

DOI:10. 11798/j. issn. 1007-1520. 201704014

· 论 著 ·

豚鼠骨髓间充质干细胞培养及体外转染神经营养因子-3 的研究

秦华丽¹, 张 杰², 蒋 明³

(1. 长沙市妇幼保健院 耳鼻咽喉科, 湖南 长沙 410007; 2. 温州医科大学附属第一医院 耳鼻咽喉科, 浙江 温州 325000; 3. 中南大学湘雅三医院 耳鼻咽喉头颈外科, 湖南 长沙 410013)

摘 要: **目的** 建立豚鼠骨髓间充质干细胞 (bone-mesenchymal stem cells, BMSCs) 的体外培养体系, 体外脂质体 2000 介导神经营养因子-3 (neurotrophic factor-3, NT-3) 转染 BMSCs, 为内耳移植提供前期研究基础。**方法** ① 采用全骨髓贴壁法培养豚鼠 BMSCs 并传代, 取 P3 代做生长曲线图, 流式细胞仪上检测 BMSCs 的表面标志物 CD29, CD90 以及造血细胞表面标志物 CD45; ② 按照不同质粒-脂质体配比介导 pEGFP-N1-NT3 转染 P3 代 BMSCs, 转染后 48 h 计算转染效率, 选择最佳配比将 pEGFP-N1-NT3 质粒转染 P3 代 BMSCs, 转染后 1、3、7、14 d, 观察其荧光表达情况; ③ 转染后 3 d 的 BMSCs 提取蛋白, Western Blot 验证 NT-3 蛋白表达。**结果** ① 全骨髓贴壁法获得细胞数量多, 增殖快, 传代可以纯化细胞。生长曲线符合 Logistic 生长曲线。流式细胞仪检测细胞 CD29 和 CD90 阳性表达, CD45 阴性表达, 符合 BMSCs 特征; ② 不同配比中质粒: 脂质体为 4 μg: 12 μl 时转染率最高, 为最佳配比; ③ 转染后 48 h 荧光表达较强, 7 d 荧光表达但较前明显减弱, 14 d 基本未见明显荧光表达。Western Blot 验证 NT-3 基因成功表达。**结论** ① 全骨髓贴壁法可以成功培养出增殖快, 细胞纯度高的 BMSCs; ② 脂质体法成功介导 NT-3 真核质粒在 BMSCs 内表达, BMSCs 可能作为内耳基因治疗的理想载体。

关 键 词: 骨髓间充质干细胞; 神经营养因子-3; 脂质体 2000; 基因转染
中图分类号: Q813; R764. 4 **文献标识码:** A [中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2017, 23(4): 353-358]

Study on in vitro culture bone marrow-derived mesenchymal stem cells of guinea pig and transfection with neurotrophic factor-3

QIN Hua-li¹, ZHANG Jie², JIANG Ming³

(1. Department of Ophthalmology and Otolaryngology, Maternal and Child Health Hospital of Changsha City, Changsha 410007, China; 2. Department of Otolaryngology, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China; 3. Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, the Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013, China)

Abstract: **Objective** To provide foundation for further study of inner ear transplantation via establishing in vitro culture system of guinea pig bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSCs) and transfecting neurotrophic factor-3 (NT-3) by Lipofectamin 2000 into BMSCs. **Methods** ① Guinea pig BMSCs were extracted, cultured and passaged by whole bone marrow direct adherent method in flasks. The third generation cells were used for detection of the surface markers CD29, CD90 of BMSCs and the surface antigen CD45 of hematopoietic cell by flow cytometry. ② BMSCs of P3 were transected with pEGFP-N1-NT3 by plasmid-liposome mixtures of different ratio. In 48 h after transfection, the transfection efficiencies of different mixtures were calculated and that with the best efficiency was chosen to transfect BMSCs of P3 with pEGFP-N1-NT3. On day 1, 3, 7 and 14 after transfection, the fluorescent expressions were observed. ③ Proteins of BMSCs were extracted on day 3 after transfection, and the expression of NT-3 was validated by Western Blot. **Results** ① By whole bone marrow direct adherent method in flasks, large amount of BMSCs were harvested. The BMSCs could proliferate

基金项目: 湖南省医药卫生科研计划项目 (C2014-13)。
作者简介: 秦华丽, 女, 硕士, 医师。
通信作者: 蒋 明, Email: zxxscdc@126.com

quickly and be purified via passage. Their growth curves accorded with Logistic growth curve. The flow cytometric detection showed positive expressions of CD29 and CD90, negative expression of CD45, which matched the characteristics of BMSCs. ②The transfection efficiency was the highest with the ratio of plasmid-liposome ($\mu\text{g}:\mu\text{l}$) at 4:12, making it the best ratio of plasmid-liposome. ③Fluorescent expression was the strongest in 48 hours after transfection, and was visible but significantly decreased in day 7, and could not be observed in day 14. Western Blot identified successful expression of NT-3 gene in BMSCs. **Conclusions** ①BMSCs of guinea pig can be cultured by whole bone marrow direct adherent method in flasks with high purity and quick proliferation. ②Eukaryotic plasmid of NT-3 can be successfully mediated by Lipofectamin 2000 and expressed in BMSCs. BMSCs may be ideal carriers of gene therapy for inner ear.

Key words: Barrow-derived mesenchymal stem cell; Neurotrophic factor-3; Lipofectamin 2000; Gene transfection

[Chinese Journal of Otorhinolaryngology-Skull Base Surgery, 2017, 23(4):353-358]

目前研究发现最常见引起重度感音神经性耳聋 (sensorineural hearing loss, SNHL) 的原因是由于听觉感觉细胞即耳蜗毛细胞损伤或缺失, 进而引起螺旋神经节细胞的退化。所以在 SNHL 的治疗中, 如何促进损伤后毛细胞和螺旋神经节细胞的再生和修复成为了当今研究的重点。最新研究显示干细胞家族中的骨髓间充质干细胞 (bone-mesenchymal stem cells, BMSCs) 作为最有潜力的种子细胞^[1], 在内耳移植的动物试验中能存活并向神经细胞样分化^[2], 同时也有研究证实神经营养因子-3 (neurotrophic factor-3, NT-3) 可以一定程度修复耳毒性药物对内耳造成的损伤^[3]。如能将细胞移植与基因治疗相结合, 用干细胞作为基因载体进行内耳移植, 可能对内耳功能的保护和恢复会更有效。本实验建立稳定豚鼠骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 的体外培养体系, 体外脂质体 2000 介导神经营养因子-3 (NT-3) 质粒 pEGFP-N1-NT3 转染 BMSCs, 观察其在 BMSCs 表达, 为内耳移植提供前期研究基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

2 周龄白毛红目豚鼠, 体重约 150 g, 中南大学湘雅三医院实验动物中心提供。

1.2 质粒

pEGFP-N1-NT3 质粒和 pEGFP-N1 质粒由湘雅三医院中心实验室提供。前期通过测序未发现质粒有基因突变。

1.3 豚鼠 BMSCs 的分离培养及鉴定

1.3.1 豚鼠 BMSCs 的分离培养 两只豚鼠 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉 (0.3 ml/100 g), 消毒, 取连同骨骺端的完整四肢骨干, 剪掉骨干两侧干骺段, 充分暴露两端的骨髓腔, 用 DMEM 培养基 (10% FBS, 100 U/ml 青霉素, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素) 反复冲洗骨髓

腔 4 ~ 5 次, 冲洗下来的细胞悬液离心, 重悬, 按 1×10^5 个/ml 的细胞密度接种到细胞培养瓶内, 恒温培养箱内培养, 标记为 P0。定期在倒置荧光显微镜下观察细胞形态变化、贴壁与否等生长情况。48 h 后首次换液, 此后 3 d 换液一次。待细胞融合度达 80% ~ 90% 时传代。显微镜下观察传代细胞的形态变化及增殖情况。

1.3.2 绘制 P3 代 BMSCs 的生长曲线 P3 代 BMSCs 细胞融合度达 80% 时消化, 制备成细胞悬液 (1×10^4 个/ml), 按每孔 1 ml 接种于 24 孔板, 共 40 孔。每天在固定的时间取 4 孔, 消化制备成细胞悬液, 进行细胞计数。取 4 孔平均值记录, 连续观察 10 d, 以时间为横坐标, 细胞数为纵坐标绘制生长曲线。

1.3.3 BMSCs 的表面标志物鉴定 选择 P3 代 BMSCs, 分别选用 FITC-CD29, PE-CD45 及 PE-CD90 (美国 BioLegend 公司的 FITC anti-rat CD29、PE anti-rat CD45、PE anti-rat CD90) 检测其表面标志物的表达率, 选择细胞不加抗体的 BMSCs 做对照。方法如下: 待 P3 代 BMSCs 融合度达到 90% 以上时, 消化, 制备细胞悬液 (细胞密度 1×10^6 个/ml), 分别取 200 μl 到 10 个 1.5 ml 离心管, 分别加入抗体 4 μl FITC-CD29, 5 μl PE-CD90, 5 μl PE-CD45 至 EP 管底部, 各 3 管, 最后 1 管细胞悬液做阴性对照。4℃ 避光, 孵育 30 min。震荡摇匀后置于低温离心机, 4℃, 2 000 r/min, 离心 5 min, 弃上清; 重复 2 次, 洗净未结合的抗体。200 μl PBS 重悬细胞, 移液枪移入流式细胞仪管底, 上流式细胞仪检测, 重复 3 次, CellQuest 软件分析。

1.4 脂质体法介导 NT-3 质粒体外转染 BMSCs

1.4.1 保存质粒的转化、抽提、纯化 CaCl₂ 法制备 JM109 感受态细菌, 加入 pEGFP-N1-NT3 质粒及 pEGFP-N1 质粒进行转化, 扩增, 抽提, 无菌处理及纯化, 紫外分光光度计检测, pEGFP-N1-NT3 质粒纯

度 1.72,浓度为 1 340 $\mu\text{g}/\text{ml}$; pEGFP-N1 质粒浓度为 1.66,浓度为 1 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。用无菌 ddH_2O ,将两种质粒稀释至 1 mg/ml ,封口 -20°C 冻存备用。

1.4.2 合适脂质体浓度选择 脂质体 2000(美国 invitrogen 公司)体积选择 10、12、16 μl ,分别与 250 μl Opti MEM 培养基混合,室温下静置 5 min; pEGFP-N1-NT-3 质粒(1 mg/ml)分别按照每孔 4 μl 加到 250 μl Opti MEM 培养基,混匀室温下静置 5 min;将两者混合,室温下静置 20 min。取 P3 代 BMSCs 按 $5 \times 10^5/\text{孔}$ 的密度接种至 6 孔板中,完全培养基定容至 2 ml,培养 24~48 h,待细胞融合度达 80%,PBS 液清洗 2 次,分别加入以上混合液,最后加入 1.5 ml Opti MEM 培养基,轻轻混匀后培养。6 h 后吸去培养液,PBS 清洗 2 遍,每孔加入不含抗生素的完全培养基 2 ml。选择 100 倍下任意 5 个视野计数,转染后 24 h 在荧光倒置显微镜下观察细胞荧光表达情况及细胞生存情况,估算其转染率。转染率 = 荧光细胞数/总细胞数。

1.4.3 pEGFP-N1-NT3 质粒和 pEGFP-N1 质粒体外转染 BMSCs 方法同上,取 pEGFP-N1-NT3 质粒(1 mg/ml)和 pEGFP-N1 质粒(1 mg/ml),脂质体 2000 按照每孔 12 μl 加入,转染后 24 h,48 h,7 d,14 d 在荧光倒置显微镜下观察细胞荧光表达情况。

1.4.4 Western Blot 验证 NT-3 蛋白表达情况 转染后 48 h 将 6 孔板细胞裂解,分别获得转染 pEGFP-N1-NT3 质粒,pEGFP-N1 质粒及空白对照的 3 管细胞蛋白,采用碧云天公司的 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒对 3 管细胞蛋白进行测定。最终转染 pEGFP-N1-NT3 质粒的蛋白样品浓度为 $2.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$,转染 pEGFP-N1 质粒蛋白浓度为 $2.2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$,未转染空白组的蛋白浓度为 $2.7 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。SDS-PAGE 电泳,转膜,美国 Santa Crus 公司兔抗人 NT-3 抗体(1:200 的一抗,1:1000 的 HRP 标记的二抗),封闭孵育,进行抗原抗体反应,用化学发光法显影。

2 结果

2.1 豚鼠 BMSCs 体外培养结果

2.1.1 BMSCs 原代培养细胞形态变化 骨髓细胞悬液在 24 h 内细胞逐渐贴壁,细胞形态主要为圆形(图 1a),48 h 换液后去未贴壁细胞,见细胞中后散在出现少许梭行或多角形细胞,但是主要还是圆形细胞(图 1b)。第 8 天,基本所有细胞表现为梭形,细胞相互融合,融合度达到约 90%。细胞之间相对

平行排列,整体呈螺旋状排列,中心细胞相对密集。此时可以进行传代(图 1c)。

2.1.2 BMSCs 传代培养细胞形态变化 传代后细胞纯度较前增高,形态越来越均匀。至 P3 代,细胞形态基本趋于一致,成梭行成纤维细胞样,未见圆形或椭圆形细胞,漩涡状生长(图 1d)。细胞增殖速度第 3~5 代细胞最快,但之后细胞随着传代,其增殖能力也逐渐减弱,第 8 代细胞较第 3~5 代细胞增殖速度明显减弱(图 1e)。

2.1.3 BMSCs 复苏后形态变化 复苏后细胞贴壁,形态于复苏前基本一致(图 1f),生长速度相对较之前缓慢,长满一瓶细胞需要 10 d 左右。

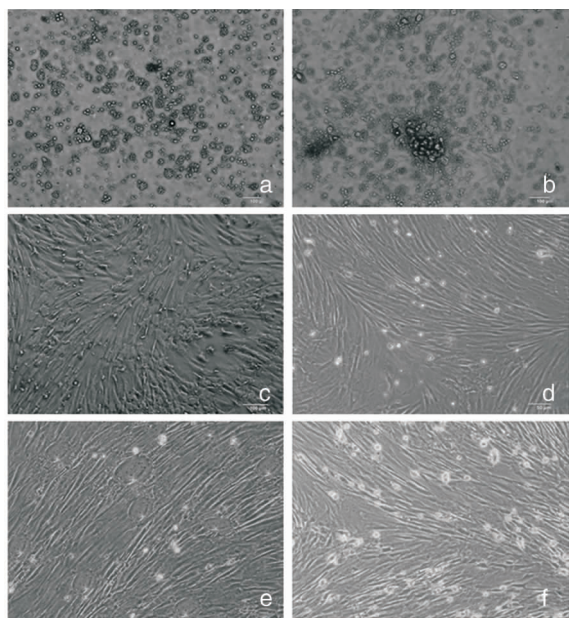


图 1 BMSCs 原代培养不同时间点的观察、传代及复苏 ($\times 100$) a、b、c:分别为原代培养 24 h、48 h、第 8 天;d、e:分别为 P3 代、P8 代细胞;f:为 P3 代复苏细胞,细胞形态基本与冻存前一致

2.2 BMSCs 的生长曲线

P3 代 BMSCs 生长曲线基本呈 S 形,第 1~4 天处于生长迟缓期,细胞生长缓慢,第 5 天开始进入快速增长期,快速增长期持续到第 8 天,在此期间细胞快速生长,之后进入平台期,基本符合 Logistic 生长曲线。具体见图 2。

2.3 BMSCs 的流式细胞仪鉴定结果

流式细胞仪检测 3 次 CD29、CD45、CD90 的阳性表达率。具体数据见表 1。CD29 表达平均为 96.14%(图 3),CD90 表达平均为 96.77%(图 4),CD45 平均表达为 7.58%(图 5)。

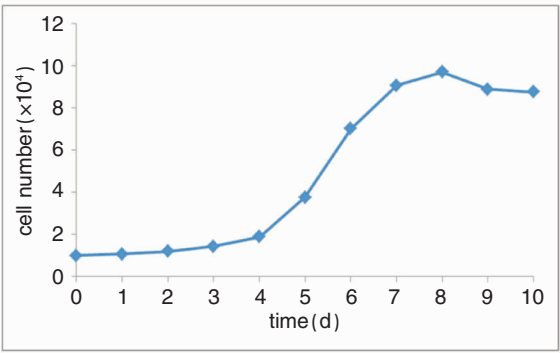


图 2 P3 代 BMSCs 生长曲线图

2.4 脂质体介导 NT-3 转染 BMSCs 结果

2.4.1 不同脂质体体积的结果 选择脂质体10、

表 1 BMSCs 表面标志物流式细胞仪鉴定结果 (%)

标志	阳性表达率			平均值
	第 1 次	第 2 次	第 3 次	
CD29	95.67	96.12	96.62	96.14
CD90	97.56	97.62	95.13	96.77
CD45	6.38	7.85	8.52	7.58

12、16 μl 分别与 4 μg pEGFP-N1-NT3 质粒混合分别转染 BMSCs 后 48 h,在白光和荧光下观察。在脂质体为 10 μl 时,细胞形态无明显变化,未见明显细胞死亡(图 6a1),荧光显微镜下可见荧光表达,转染率约 9%(图 6a2)。脂质体选择 12 μl 时细胞无明显变化,死亡细胞较 10 μl 时稍多(图 6b1),荧光显微镜下可见荧光表达,转染率 19%(图 6b2)。脂质体

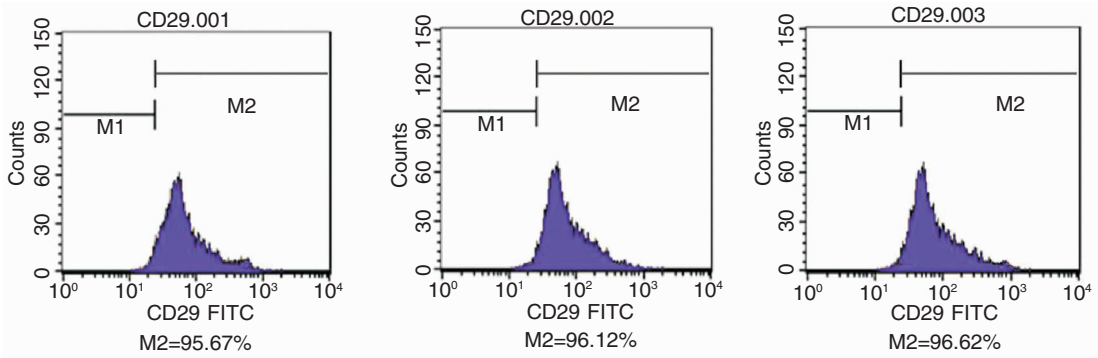


图 3 流式细胞仪检测 BMSCs 抗体 CD29 表达

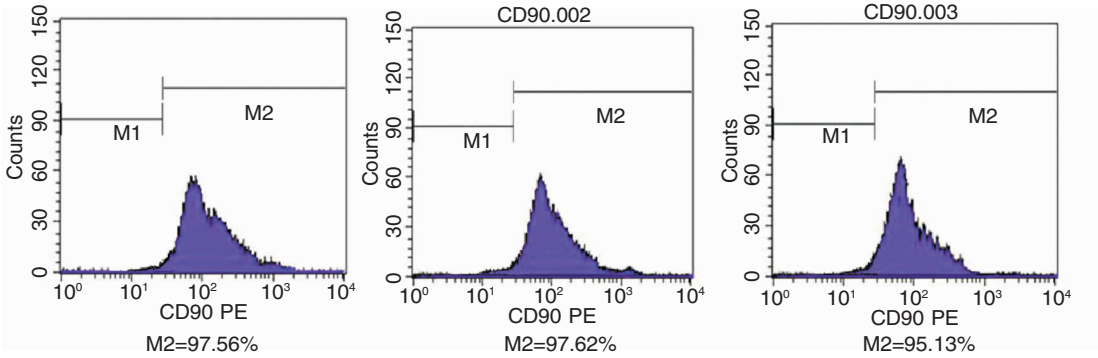


图 4 流式细胞仪检测 BMSCs 抗体 CD90 表达

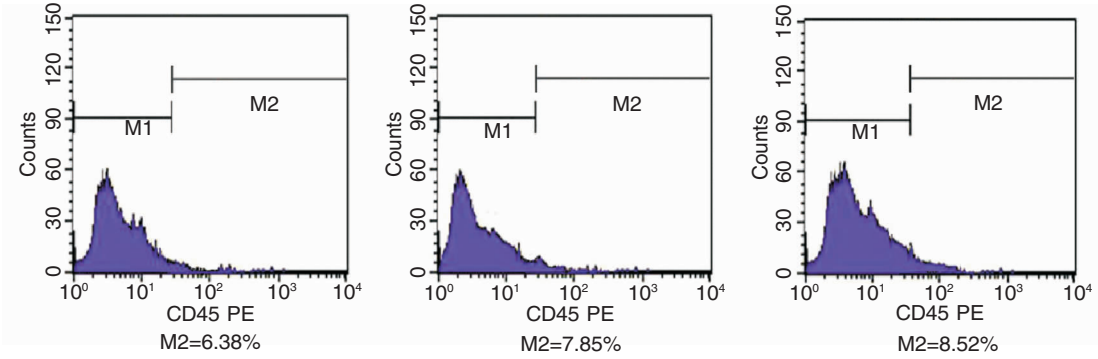


图 5 流式细胞仪检测 BMSCs 抗体 CD45 表达

选择 16 μl 可见较多死亡(图 6c1),荧光显微镜下可见荧光表达转染率约 15%(图 6c2)。根据结果,选择脂质体选择 12 μl 时细胞状态可,荧光表达率相对较高,为合适剂量。

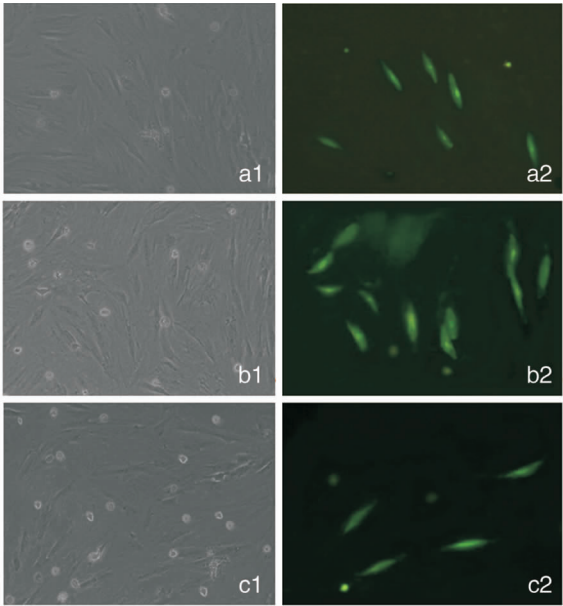


图 6 在荧光显微镜下观察不同脂质体量携带 pEGFP-N1-NT3 质粒转染 BMSCs 转染效果 ($\times 100$) a1、b1、c1 在白光下观察;a2、b2、c2 在荧光下观察

2.4.2 荧光表达时间 采用合适脂质体体积,观察其荧光表达时间。转染后 24 h 时可以见绿色荧光表达(图 7a),在 48 h 荧光表达较强(图 7b),7 d 可见荧光表达(图 7c),但表达较前明显减弱,到 14 d 视野中未见明显荧光表达(图 7d)。

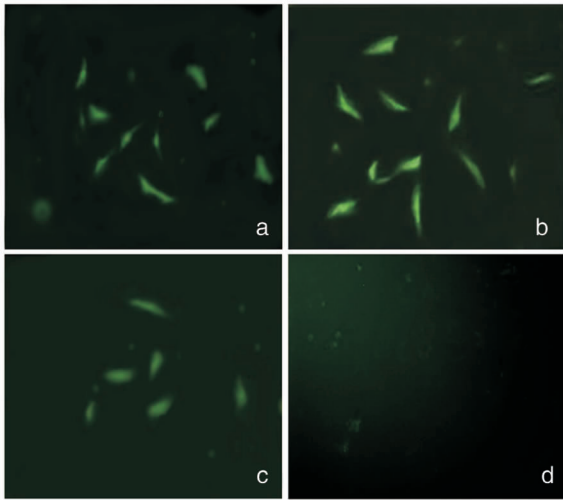


图 7 在荧光显微镜下观察脂质(12 μl)携带 pEGFP-N1-NT3 质粒转染 BMSCs 后不同时间的荧光表达 ($\times 100$) a、b、c、d 分别为转染后 24 h、48 h、7 d、14 d

2.5 Western Blot 验证结果

选择为转染的细胞组作为空白对照组(A组),转染 pEGFP-N1 质粒组为空载组(B组)和转染 pEGFP-N1-NT3 质粒组为实验组(C组)。结果显示实验组可见明显深条带,基本可以验证 NT-3 基因在 BMSCs 内的成功表达。具体见图 8。

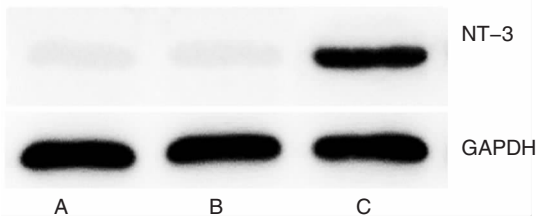


图 8 Western Blot 检测 NT-3 基因在 BMSCs 内的表达结果 A:空白对照组;B:空载组;C:实验组

3 讨论

BMSCs 存在于骨髓,作为干细胞家族一员,拥有长期自我更新和多向分化潜能。如何将 BMSCs 从骨髓所有细胞中提取出来,并获得足够的数量来进行后续实验或临床治疗也就成为大家需要解决的一个问题。目前对 BMSCs 的分离及纯化的方法暂无一个明确的标准,课题组选择贴壁法利用 BMSCs 可以贴壁生长的特性,并且通过传代可以提高细胞纯度,获得目的细胞数量较多,活性好,增殖快,基本与文献报道相符^[4];另外合适的接种密度、换液时间和合适的培养基对于 BMSCs 的体外培养也至关重要^[5-7]。但实验发现 P8 细胞增殖速度较前减慢,细胞呈现出老化。因此如何使 BMSCs 在体外长期增殖并保持正常生物特征仍然是我们后期研究中需要克服的难题。

本实验我们成功的利用脂质体将神经营养因子 NT-3 基因导入 BMSCs,也验证了 NT-3 基因在 BMSCs 内的成功表达,并且选择了合适脂质体和质粒的比例,获得了相对较高的转染效率,但较文献报道的转染率低,表达维持仅 1 周左右。我们的实验目的是为了构建携带 NT-3 基因的 BMSCs,用作后期活体动物内耳移植,观察其对损伤听觉细胞的保护作用,因此建立稳定表达 NT-3 的 BMSCs 对后期动物实验有很大帮助。如何提高原代细胞的转染率并获得稳定表达,可能有以下方法:①改变转染试剂,现有转染试剂对于难转染的细胞表现出良好的转染率,如 NanoJuiceTM 转染试剂^[8]、Lipofectamine LTX&PLUS^[9-10]等;②采用电转染,Peister 等^[11]用电

穿孔技术将 EGFP 基因导入人 BMSCs 中,瞬时转染效率约为 12%,但经过 14 d G418 筛选后,其稳定转染效率可达到 98%,刚开始虽然有较多细胞死亡,但是存活的细胞并不影响细胞生长状态及生物学特性;③核转技术(Nucleofector)是 Amaxa 公司在 2002 年发明,可以明显提高包括人骨髓间充质干细胞^[12]、软骨细胞^[13]等难转染的细胞的瞬转效率,而且转染后细胞的功能及其表型不产生影响^[14],这可能也是目前所有非病毒转染方法中转染效率最高的方法;④将环形质粒线性化后转染,虽然其转染率较低,但是通过筛选出的细胞都是目的基因插入基因组的结果^[15]。

在内耳 SNHL 治疗相关研究中,干细胞治疗和基因治疗逐渐被大家所认识,BMSCs 已经被证实可以在内耳存活^[16-17],并且向毛细胞样细胞及神经样细胞转化^[18],为 BMSC 在内耳移植提供了依据。而 NT-3 作为神经营养家族中的一员,已经被证实对内耳实验性耳聋具有保护作用^[19]。如果将干细胞进行基因修饰可以让其发挥更好的治疗疗效,BMSCs 具有相对低的免疫排斥性^[20],可以进行基因修饰后移植入宿主表达目的基因,已经有学者^[21]成功将 NT-3 导入 BMSCs 用于脊髓损伤的研究,并且成功将大鼠 BMSCs 作为治疗的载体移植入急性脊髓损伤模型体内,并发现其可以在宿主内存活并可促进损伤区神经元的存活及损伤后功能的恢复。目前暂未有把 BMSCs 作为 NT-3 基因治疗的载体用于内耳移植治疗 SNHL 的相关报道。因此前期研究将 NT-3 导入 BMSCs 对后期内耳移植提供了研究基础。

参考文献:

[1] Carlo-Stella C, Gianni MA. Biology and clinical applications of marrow mesenchymal stem cells[J]. *Pathol Biol (Paris)*, 2005, 53(3):162-164.

[2] Naito Y, Nakamura T, Nakagawa T, et al. Transplantation of bone marrow stromal cells into the cochlea of chinchillas[J]. *Neuroreport*, 2004, 15(1):1-4.

[3] Nakaizumi T, Kawamoto K, Minoda R, et al. Adenovirus-mediated expression of brain-derived neurotrophic factor protects spiral ganglion neurons from ototoxic damage[J]. *Audiol Neurotol*, 2004, 9(3):135-143.

[4] Poliseti N, Chaitanya VG, Babu PP, et al. Isolation, characterization and differentiation potential of rat bone marrow stromal cells[J]. *Neurol India*, 2010, 58(2):201-208.

[5] Neuheuber B, Swanger SA, Howard L, et al. Effects of plating density and culture time on bone marrow stromal cell characteristics[J]. *Exp Hematol*, 2008, 36(9):1176-1185.

[6] 王佳南, 张晓刚, 汤为学, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞的原代培

养条件[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(14): 2740-2745.

[7] Zhang B, Wang F, Deng L, et al. [Isolating and culturing rat marrow mesenchymal stem cells and studying their phenotypical and functional properties][J]. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 2003, 34(4):738-741.

[8] 高贺云, 魏明发, 王燕, 等. 胶质细胞源性神经营养因子和神经生长素-3 双基因转染大鼠骨髓间充质干细胞体外诱导分化为神经样细胞的研究[J]. *实用儿科临床杂志*, 2011, 26(11): 877-879.

[9] Lin SS, Ueng SW, Niu CC, et al. Hyperbaric oxygen promotes osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells by regulating Wnt3a/beta-catenin signaling--an in vitro and in vivo study[J]. *Stem Cell Res*, 2014, 12(1):260-274.

[10] 王庭阔. 脂质体介导 NT-3 基因转染对离体小鼠耳蜗细胞的保护作用研究[D]. 中南大学, 2010.

[11] Peister A, Mellad JA, Wang M, et al. Stable transfection of MSCs by electroporation[J]. *Gene Ther*, 2004, 11(2):224-228.

[12] Hamm A, Krott N, Breibach I, et al. Efficient transfection method for primary cells[J]. *Tissue Eng*, 2002, 8(2):235-245.

[13] Taylor A, Rogers MJ, Tosh D, et al. A novel method for efficient generation of transfected human osteoclasts[J]. *Calcif Tissue Int*, 2007, 80(2):132-136.

[14] Aluigi M, Fogli M, Curti A, et al. Nucleofection is an efficient nonviral transfection technique for human bone marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. *Stem Cells*, 2006, 24(2):454-461.

[15] Chancham P, Hughes JA. Relationship between plasmid DNA topological forms and in vitro transfection[J]. *J Liposome Res*, 2001, 11(2-3):139-152.

[16] Matsuoka AJ, Kondo T, Miyamoto RT, et al. Enhanced survival of bone-marrow-derived pluripotent stem cells in an animal model of auditory neuropathy[J]. *Laryngoscope*, 2007, 117(9):1629-1635.

[17] Matsuoka AJ, Kondo T, Miyamoto RT, et al. In vivo and in vitro characterization of bone marrow-derived stem cells in the cochlea[J]. *Laryngoscope*, 2006, 116(8):1363-1367.

[18] Yuan XD, Yan X, Yang H, et al. [In vitro study of directional inducible differentiation of inner ear hair cells from human adipose-derived mesenchymal stem cells][J]. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*, 2009, 44(4):323-328.

[19] Nakaizumi T, Kawamoto K, Minoda R, et al. Adenovirus-mediated expression of brain-derived neurotrophic factor protects spiral ganglion neurons from ototoxic damage[J]. *Audiol Neurotol*, 2004, 9(3):135-143.

[20] Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses[J]. *Blood*, 2005, 105(4): 1815-1822.

[21] Wang LJ, Zhang RP, Li JD. Transplantation of neurotrophin-3 expressing bone mesenchymal stem cells improves recovery in a rat model of spinal cord injury[J]. *Acta Neurochir (Wien)*, 2014, 156(7):1409-1418.

(收稿日期:2017-04-05)