doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.36.011

间充质干细胞双标记光学成像的体内试验研究 *

张 浩[1] 王 巍[2] 王 凯[1] 闫晓龙[1] 姜 雪[1] 张 同[1,3△]

（1 哈尔滨医科大学附属第四医院医学影像科 黑龙江 哈尔滨 150001；
2 哈尔滨医科大学附属第一医院磁共振室 黑龙江 哈尔滨 150001；3 黑龙江省高校分子影像重点实验室 黑龙江 哈尔滨 150001）

摘要 目的：验证双标记生物发光成像活体观测 MSCs 在肝癌裸鼠模型向肿瘤病灶的趋化作用的可行性。**方法：**应用 fluorescence（荧光）与 bioluminescence（生物发光）两种成像方法，对 MSCs 进行 CM-DiI 荧光标记及对人肝癌细胞 HepG2 进行 Fluc- 慢病毒感染并由此建立裸鼠肝癌模型，构建双标记成像系统，应用精诺真小动物光学成像仪在裸鼠肝癌模型中观测间充质干细胞向肿瘤的趋化作用。**结果：**在鼠尾静脉注射标记 MSCs 细胞后 21 天荧光成像可见 MSCs 主要积聚于肿瘤病灶处及肝脏。生物发光成像后可监测到病灶处由 luciferase 标记肿瘤细胞（HepG2）发出荧光；将荧光成像与生物发光成像所得图像经后处理融合后，可见证间充质干细胞像肿瘤病灶定向迁徙的生物过程。经肿瘤病理切片证实间充质干细胞成功迁徙至肿瘤病灶中。**结论：**应用间充质干细胞双标记光学成像系统实现 MSCs 在活体内对肿瘤的趋化过程进行观测是可行的。这种成像方法可作为下一步以 MSCs 为载体的肿瘤基因治疗的有效监测手段。

关键词：间充质干细胞；双标记；HepG2

中图分类号：R445；R735.7；Q95-3 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273（2014）36-7045-04

The Study of Dual-labeled MSCs in Vivo Optical Imaging *

ZHANG Hao[1], WANG Wei[2], WANG Kai[1], YAN Xiao-long[1], JIANG Xue[1], ZHANG Tong[1,3△]

*(1 Department of Radiology, The Fourth Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China;
2 Department of MRI Room, The First Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China;
3 The Key Laboratory of Molecular Imaging, College of Heilongjiang Province, Harbin, Heilongjiang, 150001, China)*

ABSTRACT Objective: This study was aimed at verifying the feasibility of observating MSCs migrating to tumor lesions in nude mice by double labeled bioluminescence imaging. **Methods:** Liver cancer model was established with hepatoma cell line HepG2 infected with fluc-lentivirus in nude mice. In addition, CM-DiI fluorescence was used to label the MSCs, thus double labeled methods, fluorescence and bioluminescence, were successfully generated. Xenogen small animal optical imaging instrument could be applied to observe the chemotaxis of mesenchymal stem cells to the tumor in liver cancer model of nude. **Results:** 21 days after the injection of MSCs marked cells though the rat tail vein, it was observed by fluorescence imaging, MSCs are visible mainly accumulating in tumor lesions and liver. Tumor cells (HepG2) in lesions can be monitored by the luciferase marker through bioluminescence imaging. The integration of fluorescence imaging and bioluminescence imaging after post-processing enabled the biological processes of mesenchymal stem cells migrating to tumor lesions. Tumor biopsy confirmed the success of mesenchymal stem cells migrating to the tumor lesions. **Conclusion:** The applying of mesenchymal stem cell imaging system made observation of double-labeled MSCs tumor chemotactic process feasible in vivo. This imaging method can be used to MSCs as a gene therapy vector, and it would be an effective way of monitoring.

Key words: MSCs; Dual-labeled; HepG2

Chinese Library Classification(CLC): R445; R735.7; Q95-3 Document Code: A

Article ID: 1673-6273(2014)36-7045-04

前言

肝细胞癌是在恶性肿瘤中发病率第五，癌症相关死亡率位列第三的病症[1]。对于晚期的肝癌患者，迫切的需要一个新型的有效的治疗方法。目前肿瘤的靶向基因治疗是一个非常有前景的肿瘤治疗方法，然而一个有效的将治疗基因传递到肿瘤部位的载体是目前众多研究人员所致力解决的课题之一[2-4]。近年来有研究表明骨髓间充质干细胞（MSCs）能特异地向多种肿瘤以及它们的转移灶迁移，可以作为抗癌药物的载体表达抗癌因子抑制肿瘤生长[5-7]。因此 MSCs 有可能成为肿瘤基因治疗的最佳

* 基金项目：黑龙江省自然科学基金项目（H201390）；哈尔滨市科技创新人才研究专项基金（2012RFQXS060）；
黑龙江省教育厅科学技术研究项目（1251282）

作者简介：张浩（1985-），男，硕士研究生；研究方向：心胸系统影像诊断，电话：0451-82579031，E-mail：zhanghao724@126.com
△ 通讯作者：张同（1973-），男，博士、博士后；教授、主任医师、硕士生导师，E-mail：zt415@sina.com

（收稿日期：2014-03-30 接受日期：2014-04-25）

载体。然而细胞植入研究对象体内后，其分布状况及与病灶细胞及周边组织的关系的示踪监测问题，一直是研究中左右其成功与否的关键问题。目前对于间充质干细胞向肿瘤趋化的研究仅限于单一标记干细胞。本实验拟应用双标记生物发光分子成像技术，同时标记肿瘤细胞与 MSCs，使得 MSCs 及肝癌细胞在活体内同时显像，以实现 MSCs 在活体内对肿瘤的趋化过程进行实时、无创、连续的观测。从而得到 MSCs 在活体的分布、迁移、以及对肿瘤细胞影响及相互作用等更多亚细胞水平信息，已对其趋化机制进行更深的探索，为下一步以 MSCs 为载体的基因治疗奠定实验基础。

1 实验材料与方法

1.1 实验材料

人肝癌细胞系 HepG2 购自中国科学院上海细胞库，表达 luciferase 基因载体为慢病毒购自上海吉凯基因化学试剂公司，培养 HepG2 细胞的优胎牛血清、干粉 RPMI-1640 、干粉 (DMEM) 来自 Hyclone 公司。培养干细胞试剂：胎牛血清、青霉素 、链霉素、DMEM/F12 均来自 Gibco 公司。检测间充质干细胞的 PE-CD34、FITC-CD29 、BIOTIN-CD44 、以及 APC-CD45 抗体稀释液均来自 BD Pharmimgen 公司。标记间充质干细胞的荧光标记试剂：Dil 染料来自美国 Sigma 公司。Ficoll 分离液来自美国 Sigma 公司。提取间充质干细胞的 2～3 周龄 (30～50g)清洁级雄性 Sprague Dawley(SD)大鼠由哈尔滨医科大学第二临床附属医院动物中心提供。建立肝癌动物模型的 4-6 周龄 BALB/C，nu/nu 雌性裸小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 SD 大鼠骨间充质干细胞的分离、纯化及鉴定 将 SD 大鼠断髓致死，应用 75%乙醇浸泡灭菌，随后于无菌条件下分离大鼠股骨和胫骨，用注射器冲出骨髓细胞制成单细胞悬液，经 1500 r/min 离心 3 min，重悬于 DMEM 培养液，经 Ficoll 分离液分离出单个核细胞，PBS 洗涤后用含 10%胎牛血清 DMEM/F12 重悬细胞，接种于 25 cm^2 培养瓶，置于 37℃ 、5% CO_2、恒温培养箱中培养，3 天后首次换液，以后每 2~3 d 换液 1 次，7~10 d 细胞生长融合，经 0.25%胰酶消化，1:2 传代，随后每 3 天传代 1 次，选取生长良好的第 3 代细胞分别加入适量 PE-CD34、FITC-CD29、BIOTIN-CD44、APC-CD45 抗体，流式细胞仪检测免疫表型进行分析。

1.2.2 间充质干细胞荧光标记 将培养状态良好的细胞收集，调整细胞密度 10^6/ml，遮光加入 5 μL CM-DiI，摇匀后在恒温培养箱中放置 20 min，随后离心、洗涤将标记 CM-DiI 干细胞常规培养，每日观察。

1.2.3 人肝癌细胞 HepG2 的 Fluc- 慢病毒感染 病毒转染选取复苏培养至第 5 代处于对数生长期的 HepG2 细胞。应用 Fluc- 慢病毒(萤火虫荧光素酶)按照感染操作手册推荐方法对 HepG2 细胞进行标记。

1.2.4 裸鼠人肝癌 HepG2 移植瘤动物模型的建立 选取 5 只 4-6 周龄的雌性裸鼠。将处于对数生长期的标记 FLuc 报告基因 HepG2 细胞制成 5× 10^6 个 /ml 的细胞悬液，在无菌条件下每只裸鼠腹部或背部皮下接种 0.2 mL。

1.2.5 CM-Dil 标记 MSCs 活体示踪成像 裸鼠肿瘤模型建立 15 天，肿瘤体积约达到 1 cm^3 后，经鼠尾注射量为 1× 10^5 CM-Dil 标记的间充质干细胞。再注射干细胞后的第 1 天及 3、14、21 天，应用精诺真小动物成像仪对裸鼠肿瘤模型进行干细胞 fluorescence 光学成像及肝癌 HepG2 肿瘤细胞 bioluminescence 光学成像，并在成像后对两组采集的图像进行融合。

1.2.6 人肝癌 HepG2 肿瘤组织取材及病理形态观察 在裸鼠种瘤后第 40 天断髓处死，对肿瘤进行切除，并 HE 染色制片，病理验证间充质干细胞向肿瘤趋化情况。

2 结果

2.1 大鼠骨间充质干细胞的分离、培养、纯化及鉴定的结果

经由 Ficoll 分离液密度分离和贴壁培养 MSCs 培养至第 3 代，形态上呈纺锤形并呈有序的漩涡状排列。经流式鉴定得出，细胞表面 CD45 及 CD34 阴性表达，CD44 及 CD29 阳性表达，结果符合骨髓间充质干细胞表面特异性标记物表达 (图 1)。

2.2 间充质干细胞 CM-Dil 荧光标记

经 CM-dil 标记的间充质干细胞，在精诺真成像仪检测到

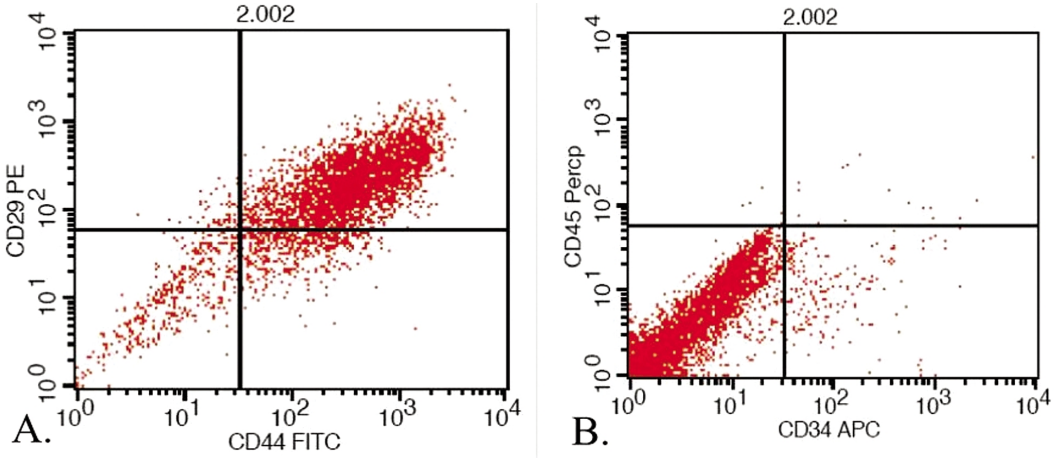


图 1 A 为经流式细胞仪鉴定 CD29(+)，CD44(+)；B 为经流式细胞仪鉴定 CD34(-)，CD45(-)

Fig. 1 A is the identification of CD29(+) and CD44(+) by flow cytometry; B is the identification of CD34(-)and CD45(-) by flow cytometry

较强的荧光发出，如图 2。

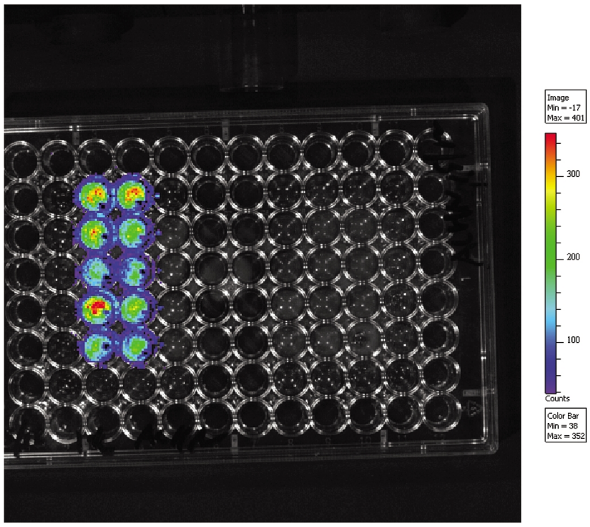


图 2 标记后的 MSCs

Fig. 2 Marked MSCs

2.3 CM-Dil 标记的间充质干细胞活体示踪

在鼠尾静脉注射细胞前及注射后 1d、3d、14d、21d，裸鼠进行干细胞 fluorescence 光学成像显示，在细胞注入的第一天，MSCs 主要积聚于肺脏及肝脏、脾脏等脏器，并逐步迁徙至肿瘤区域，而到 21 天则主要积聚与肿瘤病灶处及肝脏。

2.4 CM-Dil 标记 MSCs 与 Fluc-HepG2 细胞活体示踪图像融合

生物发光成像后可监测到病灶处由 luciferase 标记肿瘤细胞（HepG2）发出荧光；将荧光成像与生物发光成像所得图像经后处理融合后，可见证间充质干细胞像肿瘤病灶定向迁徙的生物过程（见图 3）。

2.5 HepG2 人肝癌裸鼠移植瘤 HE 染色及间充质干细胞离体检测

将在生物发光成像呈阳性的病灶区域经 HE 染色，判定为肿瘤组织；在荧光成像中的阳性区域经 CD29 免疫组化染色，可判定为 MSCs 所迁徙区域。经对肿瘤组织离体切片染色后发现其病灶内可见散在的棕黄色染色，可证实为迁徙至肿瘤组织中的间充质干细胞，如图 4。

3 讨论

肿瘤的基因靶向治疗被认为是目前最有前景的肿瘤治疗方法。为提高基因治疗的效率，多年来人们不断寻求理想的载体。理想的载体需具备靶向目标的特异性，制备的便捷性，功效的稳定性及安全无毒性无生物危害性等特点[8]。骨髓间充质干细胞是一类来源于骨髓基质的干细胞，具备来源丰富，分离取材方便，并且可以在体外大量培养增殖的特点。另外，MSCs 还被证明具有低免疫原性[9]，安全无生物危害性[10]以及表达外援基因稳定[11]的特点。近年来研究者们又证明 MSCs 具有向多种肿瘤定向的趋化性[12-14]。Shinojima N 等人成功的运用 MSCs 作

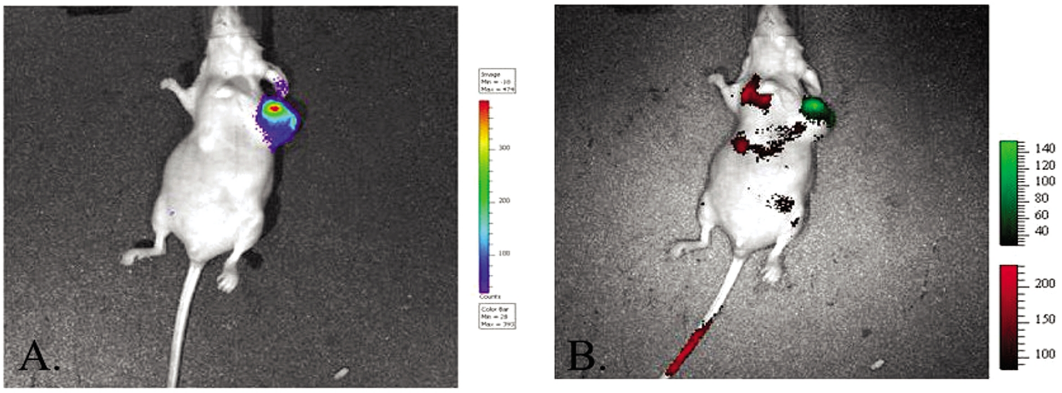


图 3 A 为生物发光成像；B 为融合图像

Fig. 3 A is bioluminescence imaging; B is a fused image

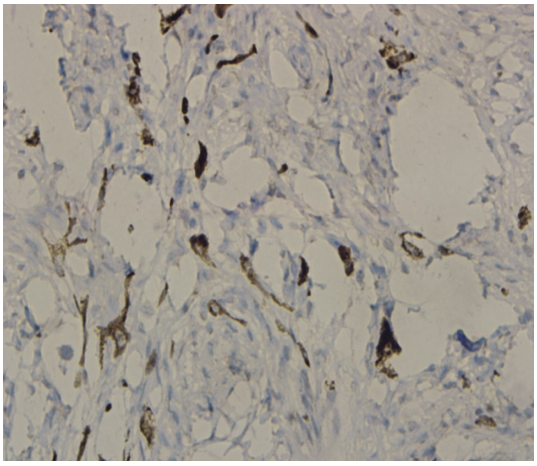


图 4 病灶内间充质干细胞 CD29 染色（× 400）

Fig. 4 Mesenchymal stem cells CD29 staining in lesions（× 400）

为 TGF -β 基因载体对胶质瘤动物模型进行治疗[15]，Chen Q 等人也成功的运用 MSCs 作为 PEDF 基因载体对肺癌模型进行治疗[16]。基于上述原因，骨髓间充质干细胞成为肿瘤基因靶向治疗的最有前景载体[17]。

在基因治疗实验的过程中，能否对疗效实行实时有效的监测，对实验的监控和改善起着至关重要的作用。目前的相关研究主要仅限于单一标记干细胞，在特定时间后处死动物，取肿瘤组织病理标本检测分布情况，这种方法因其操作复杂，且周期长，需要处死动物模型，所以具有时间成本及经济成本高等缺陷。而且在进行基因治疗实验中，是一个连续的生物过程，对 MSCs 的单一标记无法明确 MSCs 在趋化至肿瘤细胞后与肿瘤之间的相互关系及连续时间的治疗效果。而本研究的特色正是 fluorescence（荧光）与 bioluminescence（生物发光）两种成像方

法,对 MSCs 及肿瘤细胞均进行了示踪标记,构建了双标记成像系统,这样可以利用生物发光成像无创在活体观察 MSCs 向肝癌细胞趋化的生物过程。

应用可靠方法获得纯化的间充质干细胞是进行干细胞实验的先决条件。在本研究中,我们应用密度梯度离心法分离获得骨髓单个核细胞,接种于含 10%胎牛血清的 DMEM/F12 的低糖培养液中,细胞传至 3 代大部分形态上呈纺锤形状并有序的以漩涡状排列。利用流式细胞术进行鉴定,细胞表面 CD45 及 CD34 阴性表达,CD44 阳性及 CD29 阳性表达,符合骨髓间充质干细胞的表面特异性标记物的表达情况,说明经密度梯度离心法分离并经贴壁培养于含 10%胎牛血清的 DMEM/F12 的低糖培养液中可以成功获得较为纯化的骨髓间充质干细胞。

高效的标记干细胞及转染肿瘤细胞是本实验的关键。在本研究中,选择 CM-DiI 染料对干细胞进行标记,因为 CM-DiI 是一种亲脂性的羰花青荧光染料,在活细胞状态下与细胞膜紧密结合,标记细胞具有的毒性非常微弱,且产生强度较大的荧光,广泛应用于细胞的标记与示踪成像[18-20]。在本研究中间充质干细胞标记后,检测后数据显示该染料标记的效率可达 99%以上,在成像仪下可见细胞发出较明亮的荧光,标记后约 21 d 仍可见较清晰的生物荧光,但与最开始标记的信号相比荧光强度要略显低一些,可能是在细胞换液或传代过程中在遮光方面难度较大,而且每次观察所造成的荧光衰减也无法避免。由于生物发光成像(BLI)可将目的细胞转染入能够稳定表达荧光素酶的报告基因,然后将细胞植入活体内,可使荧光素酶在体内随着细胞的增殖而增殖[21-23],所以在本研究中我们运用 Fluc- 慢病毒转染人肝癌 HepG2 细胞,使得萤火虫荧光素酶随着 HepG2 细胞的增殖而增殖,从而可以对肿瘤细胞实时成像。在本实验中,HepG2 细胞感染后生长状态良好,荧光强度稳定。

在本研究中,应用干细胞示踪的双标记成像系统,成功的在活体中监测到了间充质干细胞向肿瘤病灶的趋化过程,并得到了 CM-Dil 标记的间充质干细胞与 Fluc-HepG2 肿瘤细胞活体示踪的融合图像,见证了干细胞向肿瘤的迁徙过程,最终在 HepG2 人肝癌裸鼠移植瘤 HE 染色及间充质干细胞离体检测中,也证实了肿瘤组织中的间充质干细胞的存在。

所以本研究证实了应用干细胞示踪的双标记成像系统同时标记肿瘤细胞与 MSCs,使得 MSCs 及 HepG2 细胞在活体内同时显像,以实现 MSCs 在活体内对肿瘤的趋化过程进行实时、无创、连续的观测是可行的。这种成像方法可作为下一步以 MSCs 为载体的肿瘤基因治疗的有效监测手段。

参 考 文 献(References)

[1] Lau WY, Lai EC. Hepatocellular carcinoma: current management and recent advances[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2008, 7(3): 237-257

[2] Liu L, Wang S, Shan B, et al. Advances in viral-vector systemic cytokine gene therapy against cancer[J]. Vaccine, 2010, 28(23): 3883-3887

[3] Schirrmacher V, Fournier P. Newcastle disease virus: a promising vector for viral therapy, immune therapy, and gene therapy of cancer [J]. Methods Mol Biol, 2009, 542: 565-605

[4] Kaiser J. Clinical research. Death prompts a review of gene therapy vector[J]. Science, 2007, 317(5838): 580

[5] Studeny M, Marini F. C, Champlin R. E, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors[J]. Cancer Res, 2002 , 62 (13): 3603-3608

[6] Komarova S, Kawakami Y, Stoff-Khalili M. A., et al. Mesenchymal progenitor cells as cellular vehicles for delivery of oncolytic adenoviruses[J]. Mol. Cancer Ther, 2006, 5(3): 755-766

[7] Elzaouk L, Moelling K, Pavlovic J. Anti-tumor activity of mesenchymal stem cells producing IL-12 in a mouse melanoma model[J]. Exp. Dermatol, 2006, 15(11): 865-874

[8] Dong JY, Worarattanadharm J. Gene therapy vector design strategies for the treatment of cancer[J]. Future Oncol, 2005, 1(3): 361-373

[9] Kosztowski T, Zaidi H A, Quinone H A. Application of neural and mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas [J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2009, 9(5): 597-612

[10] Reiser J, Zhang XY, Hemenway CS, et al. Potential of mesenchymal stem cells in gene therapy approaches for inherited and acquired diseases[J]. Expert Opin Biol Ther, 2005, 5(12): 1571-1584

[11] 邱林,金先庆.骨髓间充质干细胞的生物学特性及临床治疗应用[J].中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(12): 2347-2350
Qiu Lin, Jin Xian-qing. Biological characteristics and clinical application of bone marrow mesenchymal stems [J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Reserch. 2008, 12(12): 2347-2350

[12] Menon L G, Picinich S, Koneru R, et al. Differential dene expression associated with migration of mesenchymal stem cells to conditioned medium from tumor cells or bone marrow cells[J]. Stems Cells,2007, 25: 520-528

[13] Khakoo A Y, Pati S, Anderson S A, et al. Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma[J]. J Exp Med, 2006, 203: 1235-1247

[14] Gao P, Ding Q, Wu Z, et al. Therapeutic potential of human mesenchymal stem cells producing IL-l2 in a mouse xenograft model of renal cell carcinoma[J]. Cancer Lett, 2010, 290: 157-166

[15] Hakkarainen T, Särkioja M, Lehenkari P, et al. Human mesenchymal stem cells lack tumor tropism but enhance the antivity of oncolytic adenoviruses in orthotopic lung and breast tumors [J]. Hum Gene Ther, 2007, 18: 627-641

[16] Shinojima N, Hossain A, et al. TGF-β mediates homing of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells to glioma stem cells [J]. Cancer Research, 2013, 73(7): 2333-2344

[16] Chen Q, Cheng P, Yin T, et al. Therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells producing pigment epithelium-derived factor in lung carcinoma[J]. Int J Mol Med, 2012, 30(3): 527-534

[17] Okada T. Gene therapy with vector-producing multipotent mesenchymal stomal cells[J]. Yakugaku Zasshi, 2010, 130(11): 1513-1518

[18] Hu KX, Wang MH, Fan C, et al. CM-Dil labeled mesenchymal stem cells homed to thymus inducing immune recovery of mice after haploidentical bone marrow transplantation[J]. Int Immunopharmacol , 2011, 11(9): 1265-1270

[19] Kim HG, Choi OH. Neovascularization in a mouse model via stem cells derived from human fetal amniotic membranes[J]. Heart Vessels, 2011, 26(2): 196-205

(下转第 7181 页)

参 考 文 献(References)

[1] 隋峰, 霍海如, 姜廷良,等. 痛觉感受相关的 TRP 离子通道蛋白研究进展[J].中国疼痛医学杂志, 2009, (01): 50-53

[2] Goldin AL, Barchi RL, Caldwell JH, etal.Nomenclature of voltage-gated sodium channels[J]. Neuron, 2000, 28(2): 365-368

[3] He XH, Zang Y, Chen X, et al. TNF-alpha contributes to up-regulation of Nav1.3 and Nav1.8 in DRG neurons following motor fiber injury [J]. Pain, 2010, 151(2): 266-279

[4] Zang Y, Xin WJ, Pang RP, et al. Upregulation of Nav1.3 Channel Induced by rrTNF in Cultured Adult Rat DRG Neurons via p38 MAPK and JNK Pathways[J]. Chin J Physiol, 2011, 54(4): 241-246

[5] Hains BC, Saab CY, Klein JP, et al.Altered sodium channel expression in second-order spinal sensory neurons contributes to pain after peripheral nerve injury[J]. J Neurosci, 2004, 24(20): 4832-4839

[6] Lindia JA, Kohler MG, Martin WJ, et al. Relationship between sodium channel NaV1.3 expression and neuropathic pain behavior in rats[J]. Pain, 2005, 117(1-2): 145-153

[7] Nassar MA, Baker MD, Levato A, et al. Nerve injury induces robust allodynia and ectopic discharges in Nav1.3 null mutant mice [J]. Mol Pain, 2006, 2: 33

[8] Yang Y, Wang Y, Li S, et al. Mutations in SCN9A, encoding a sodium channel alpha subunit, in patients with primary erythermalgia [J]. J Med Genet, 2004, 41(3): 171-174

[9] Cummins TR, Dib-Hajj SD, Waxman SG. Electrophysiological properties of mutant Nav1.7 sodium channels in a painful inherited neuropathy[J]. J Neurosci, 2004, 24(38): 8232-8236

[10] Cox JJ, Reimann F, Nicholas AK, et al. An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain [J]. Nature, 2006, 444 (7121): 894-898

[11] Yang S, Xiao Y, Kang D, et al. Discovery of a selective NaV1.7 inhibitor from centipede venom with analgesic efficacy exceeding morphine in rodent pain models [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(43): 17534-17539

[12] Lee JH, Park CK, Chen G, et al. A monoclonal antibody that targets a NaV1.7 channel voltage sensor for pain and itch relief [J]. Cell, 2014, 157(6): 1393-1404

[13] Cejudo-Roman A, Pinto FM, Subiran N, et al. The voltage-gated sodium channel nav1.8 is expressed in human sperm [J]. PLoS One, 2013, 8(9): 76084

[14] Bird EV, Christmas CR, Loescher AR, et al. Correlation of Nav1.8 and Nav1.9 sodium channel expression with neuropathic pain in human subjects with lingual nerve neuromas[J]. Mol Pain, 2013, 9: 52

[15] Kao DJ, Li AH, Chen JC, et al. CC chemokine ligand 2 upregulates the current density and expression of TRPV1 channels and Nav1.8 sodium channels in dorsal root ganglion neurons [J]. J Neuroinflammation, 2012, 9: 189

[16] Zhao R, Pei GX, Cong R, et al. PKC-NF-kappaB are involved in CCL2-induced Nav1.8 expression and channel function in dorsal root ganglion neurons[J]. Biosci Rep, 2014, 34(3)

[17] Su YY, Ye M, Li L, et al. KIF5B promotes the forward transport and axonal function of the voltage-gated sodium channel Nav1.8 [J]. J Neurosci, 2013, 33(45): 17884-17896

[18] Faber CG, Lauria G, Merkies IS, et al. Gain-of-function Nav1.8 mutations in painful neuropathy [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(47): 19444-19449

[19] Han C, Vasylyev D, Macala LJ, et al. The G1662S Nav1.8 mutation in small fibre neuropathy: impaired inactivation underlying DRG neuron hyperexcitability [J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2014, 85 (5): 499-505

[20] Rugiero F, Mistry M, Sage D, et al. Selective expression of a persistent tetrodotoxin-resistant Na^+ current and NaV1.9 subunit in myenteric sensory neurons[J]. J Neurosci, 2003, 23(7): 2715-2725

[21] Wells JE, Bingham V, Rowland KC, et al. Expression of Nav1.9 channels in human dental pulp and trigeminal ganglion [J]. J Endod, 2007, 33(10): 1172-1176

[22] Black JA, Vasylyev D, Dib-Hajj SD, et al. Nav1.9 expression in magnocellular neurosecretory cells of supraoptic nucleus [J]. Exp Neurol, 2014, 253: 174-179

[23] Rush AM, Waxman SG. PGE2 increases the tetrodotoxin-resistant Nav1.9 sodium current in mouse DRG neurons via G-proteins [J]. Brain Res, 2004, 1023(2): 264-271

[24] Ostman JA, Nassar MA, Wood JN, et al. GTP up-regulated persistent Na^+ current and enhanced nociceptor excitability require NaV1.9[J]. J Physiol, 2008, 586(4): 1077-1087

[25] Huang J, Han C, Estacion M, et al. Gain-of-function mutations in sodium channel Na(v)1.9 in painful neuropathy[J]. Brain, 2014, 137 (Pt 6): 1627-1642

[26] Liang J, Liu X, Zheng J, et al. Effect of amitriptyline on tetrodotoxin-resistant Nav1.9 currents in nociceptive trigeminal neurons [J]. Mol Pain, 2013, 9: 31

(上接第 7048 页)

[20] Meng BX, Zheng Y, Yang Y, et al. Impact of third-party bone marrow mesenchymal stem cells on allogenic skin transplantation[J]. Chinese Journal of Plastic Surgery, 2010, 26(2): 120-125

[21] Close DM, Xu T, Sayler GS, et al. In vivo bioluminescent imaging (BLI): noninvasive visualization and interrogation of biological processes in liviganimals[J]. Sensors (Basel), 2011, 11(1): 180-206

[22] Jenkins DE, Oei Y, Hornig YS, et al. Bioluminescent imaging (BLI) to improve and refine traditional murine models of tumor growth and metastasis[J]. Clin Exp Metastasis, 2003, 20(8): 733-744

[23] Pichler A, Prior JL, Luker GD, et al. Generation of a highly inducible Gal4-->Fluc universal reporter mouse for in vivo bioluminescence imaging[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(41): 15932-15937