

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.002802

热休克预处理对化疗环境下骨髓间充质干细胞存活率的影响及机制

李欣然¹, 王 清², 汪庆如¹, 谢嘉欣¹, 朱洪磊¹, 周曼萍¹, 肖苑玲¹, 付霞霏¹

(1. 南方医科大学珠江医院妇产科, 广州 510282; 2. 香港大学深圳医院妇产科, 深圳 518053)

【摘要】目的:探索热休克预处理(heat shock pretreatment, HSP)对化疗微环境下骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)的影响及其潜在机制。**方法:**探索 HSP 最佳条件, 往热休克预处理 BMSCs(heat shock pretreated bone marrow mesenchymal stem cells, HS-MSCs)培养基中加入顺铂, 通过 CCK-8 检测细胞增殖率, Hoechst33342/PI 测定存活率, 流式细胞仪检测凋亡率。使用 Western blot 检测不同时间点 HS-MSCs 热休克蛋白 70(heat shock protein 70, Hsp70)、Hsp90、自噬相关蛋白 Beclin1 和 LC3B 的表达。通过透射电镜观察自噬小体数量。**结果:**加入顺铂后, 热休克模型组凋亡率明显低于模型组。此外, 热休克模型组增殖速率较模型组增加, 而表达亮蓝色/暗红色荧光的比例则低于模型组。HS-MSCs 内 Hsp70 和 Hsp90 的表达随时间推移逐渐上调, 并在 48 h 后达峰值。同时, 细胞内自噬小体减少、Beclin1 表达降低、LC3B II/LC3B I 比值下降。**结论:**HSP 能够提高化疗微环境下 BMSCs 的存活与抗凋亡能力, 其作用可能与 HSP 增强 Hsp70 及 Hsp90 的表达、减弱自噬水平有关。

【关键词】热休克; 骨髓间充质干细胞; 化疗; 热休克蛋白; 自噬**【中图分类号】**R711.75**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2020-07-09

Effect and mechanisms of heat shock pretreatment on bone marrow mesenchymal stem cells viability in chemotherapy environment

Li Xinran¹, Wang Qing², Wang Qingru¹, Xie Jiaxin¹, Zhu Honglei¹, Zhou Manping¹, Xiao Yuanling¹, Fu Xiafei¹

(1. Department of Obstetrics and Gynecology, Zhujiang Hospital, Southern Medical University; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, Shenzhen Hospital, The University of Hong Kong)

【Abstract】Objective: This study aims to explore the potential effects and mechanisms of heat shock pretreatment(HSP) on bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) in chemotherapy microenvironment. **Methods:** The optimal condition of HSP was identified. Cisplatin was added to the heat shock pretreated bone marrow mesenchymal stem cells(HS-MSCs) medium to simulate the chemotherapy microenvironment. The effect of HSP on the biological characteristics of HS-MSCs was explored. The proliferation of BMSCs was detected by CCK-8 assay, the viability was measured by Hoechst33342/PI, and the apoptosis was detected by flow cytometry. The potential mechanisms of HSP were further explored from the perspective of heat shock proteins and autophagy. The expression of heat shock protein 70(Hsp70), Hsp90, Beclin1 and LC3B after HSP were detected by Western blot. The number of autophagosomes was observed by transmission electron microscopy. **Results:** In simulated chemotherapy microenvironment, the apoptosis rate of heat shock model group was lower than that of model group. In addition, the proliferation rate of the heat shock model group was higher than that of the model group, while the ratio of bright blue/dark red fluorescence cells was lower than that of the model group. The expressions of Hsp70 and Hsp90 were significantly up-regulated with time and reached the peak at 48 hours after HSP. Meanwhile, the number of autophagosomes, the expression of Beclin1 and the ratio of LC3B II/LC3B I were all decreased after HSP. **Conclusion:**

HSP can improve the viability and anti-apoptosis ability of BMSCs under the chemotherapy microenvironment, and its effect may be related to the enhancement of Hsp70 and Hsp90 expressions and the weakening of autophagy level.

【Key words】heat shock; bone marrow mesenchymal stem cells; chemotherapy; heat shock protein; autophagy

作者介绍: 李欣然, Email: gladlee12@163.com,

研究方向: 妇科内分泌。

通信作者: 付霞霏, Email: fxf1997@smu.edu.cn。

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(编号: 2018A030313167、2020A1515010205)。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20210513.1412.010.html>
(2021-05-15)

在中国,每年大约有 169 万名妇女罹患癌症。在排名前 5 位的癌症中,2.78% 的患者年龄在 30 岁以下,12.25% 的患者年龄在 30~44 岁^[1]。因此,接受放疗的育龄女性患者发生早发性卵巢功能不全 (premature ovarian insufficiency, POI) 的概率较前大为增加^[2]。

间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 具有分化潜能,参与某些疾病的归巢、组织细胞再生、免疫调节和损伤修复^[3-4]。目前, MSCs 被广泛应用于治疗多种疾病,如 POI^[5]、肌腱修复^[6]、过敏性哮喘^[7]等。然而,在临床中 MSCs 的实际治疗潜能往往低于预期,这一现象与细胞移植后低存活率及增殖率密切相关^[8]。此外,化疗所造成的毒性环境可能导致更高的移植后细胞死亡率^[9]。因此,改善移植后 MSCs 存活率是提高其在化疗性 POI 疗效的关键。

热休克预处理是一种有效提高 MSCs 存活力、抑制其凋亡率的方法^[10]。在细胞和动物实验中, HSP 均能提高移植 MSCs 的存活率,从而获得更好的细胞和组织修复能力^[11]。 MSCs 存活力的改善与热休克蛋白水平增加以及自噬的激活相关^[12]。经过 HSP 的 MSCs 能够分泌一种有效的细胞保护剂——热休克蛋白,通过激活下游与细胞周期、增殖和凋亡相关的通路发挥细胞保护作用^[13]。此外, HSP 还通过激活 H₂O₂ 诱导的大鼠 MSCs 发生自噬,提高其在急性心肌梗死的存活率和修复能力^[14]。然而,热休克预处理 BMSCs 中热休克蛋白水平随时间的变化趋势;以及在顺铂模拟的化疗微环境下, HSP 是否通过激活自噬提高大鼠骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 的存活力,目前鲜有报道。

本研究旨在探讨 HSP 在改善化疗微环境下大鼠 BMSCs 存活力中的作用。此外还从热休克蛋白及自噬水平的角度对热休克预处理改善 BMSCs 存活力的潜在机制进行初步探索,为热休克预处理 BMSCs 的临床应用丰富理论基础。

1 材料及方法

1.1 实验动物

4~5 周雌性 Wistar 大鼠 (体质量 80~100 g) 购自南方医科大学实验动物中心。在室温 (23±2)℃ 条件下,光照 12 h,自由摄食水适应性饲养 7 d。本研究符合作者所在单位实验动物伦理委员会所制定的伦理学标准。

1.2 BMSCs 的分离、培养及鉴定

将大鼠脱臼处死后在无菌条件下取出胫骨和股骨,剥离

肌肉后剪去两端,用注射器吸取完全培养基 (含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基) 反复冲洗胫骨、股骨骨髓腔,直至骨髓腔发白。骨髓细胞悬液 2 500 r/min 离心 20 min,使用 PBS 洗 2 次后加完全培养基重悬,按 1×10⁶ 个细胞/mL 将细胞接种培养。取第 3 代大鼠 BMSCs,用流式细胞仪检测鉴定 CD34、CD45、CD29 和 CD44。

1.3 热休克预处理最佳时间的确定

将 BMSCs 分为 5 组:正常组、30 min 组、1 h 组、2 h 组、3 h 组。正常组不作其他处理,后 4 组将间充质干细胞培养瓶置于 42℃ 恒温水浴箱分别处理 30 min、1 h、2 h、3 h。水浴结束后更换新鲜培养基,在 37℃、5% CO₂ 条件下常规培养 24 h、48 h、72 h,使用流式细胞仪检测 BMSCs 凋亡。

1.4 热休克预处理 BMSCs 的生物学特性改变及潜在机制

细胞分为 4 组:空白对照组、热休克组、模型组、热休克模型组,用于检测热休克预处理 BMSCs (heat shock pretreated bone marrow mesenchymal stem cells, HS-BMSCs) 生物学特性。其中空白对照组不作处理;热休克组将 BMSCs 置入 42℃ 恒温水浴箱处理 1 h 后常规培养 48 h;模型组将 BMSCs 培养基中加入 5 mg/L 顺铂常规培养 48 h;热休克模型组 BMSCs 置入 42℃ 恒温水浴箱处理 1 h,更换新鲜培养基后加入 5 mg/L 顺铂继续常规培养 48 h。收获细胞后使用 CCK-8 检测细胞增殖率,使用 Annexin-V/PI 法检测细胞凋亡率及 Hoechst33342/PI 测定细胞存活率。

在上述分组的基础上,增加 3-甲基腺嘌呤 (3-methyladenine, 3-MA) 组和雷帕霉素组,从自噬角度探索其生物学特性改变的潜在机制。其中 3-MA 组将 BMSCs 置入 42℃ 恒温水浴箱处理 1 h,更换新鲜培养基后加入 5 mg/L 顺铂继续常规培养 24 h,随后加入自噬抑制剂 3-MA 继续培养 24 h;雷帕霉素组将 BMSCs 置入 42℃ 恒温水浴箱处理 1 h,更换新鲜培养基后加入 5 mg/L 顺铂继续常规培养 24 h,随后加入自噬启动子雷帕霉素继续培养 24 h。收集细胞使用 Western blot 检测自噬相关抗体 Beclin1 及 LC3B 蛋白水平,采用透射电镜下观察自噬小体的形成。

此外还从热休克蛋白角度阐述潜在机制。将 BMSCs 分为 7 组,热休克预处理后分别常规培养 0 h、2 h、24 h、48 h、72 h、96 h 和 120 h。收集各组细胞,使用 Western blot 检测热休克蛋白 (heat shock protein, Hsp) 70 和 Hsp 90 的表达。

1.4.1 CCK-8 检测细胞增殖率 将各组细胞密度调整为 2×10⁵ 个/mL,以 100 μL/孔接种于 96 孔板,每组 5 孔细胞。各组细胞根据不同条件处理后,分别加入 10 μL CCK-8 测试液,在 37℃、5% CO₂ 条件下孵育 2 h。使用全自动酶标仪于 490 nm 波长处测定光密度 (optical density, OD) 值,计算各组细胞增殖率。以后每天相同时间每组各取 5 孔细胞重复上述操作,连续 7 d。

1.4.2 Annexin-V/PI 法检测细胞凋亡率 在 72 h 时间点收集各组细胞,用 PBS 洗涤 3 次。加入 195 μL 结合缓冲液和 5 μL Annexin V-FITC,在室温下避光孵育 10 min,然后加入 190 μL 结合缓冲液和 10 μL PI,室温下避光孵育 15 min。用 FACS 流式细胞仪分析结果。

1.4.3 Hoechst33342/PI 测定细胞存活率 收集各组细胞悬液,加入 4%多聚甲醛固定 15 min。PBS 洗涤 3 次,随后加入 Hoechst33342 室温避光染色 5 min,后加入 PI 染色液,4℃ 孵育 30 min。PBS 洗涤 3 次,使用抗淬灭封片液封片,在荧光显微镜下观察细胞染色情况。

1.4.4 Western blot 检测 Hsp70 和 Hsp90 的表达 往各组细胞中加入 RIPA 裂解液冰上裂解 5 min,使用 BCA 蛋白质检测试剂盒检测蛋白浓度。蛋白质裂解物在 100℃ 变性 5 min,蛋白质组分通过 12% SDS-PAGE 分离并转移到 PVDF 膜上。在 TBST 中用 5%脱脂奶粉封闭后,与小鼠单克隆抗 Hsp70 抗体(1:1 000)和小鼠单克隆抗 Hsp90 β 抗体(1:2 500)在 4℃ 过夜孵育。随后与过氧化物酶结合的山羊抗鼠 IgG(H+L)抗体(1:2 000)室温孵育 26 min。使用 ECL 试剂盒观察免疫反应性。小鼠单克隆抗 β -Actin(1:2 000)作为 Marker,并用 Image 16.7 软件进行结果分析。每个样本重复 3 次。

1.4.5 Western blot 检测自噬相关抗体 Beclin1 及 LC3B 蛋白水平 步骤同热休克蛋白检测。一抗为抗兔单克隆抗 Beclin1 抗体(1:2 000)和兔单克隆抗 LC3B 抗体(1:2 000),二抗为过氧化物酶结合山羊抗小鼠 IgG(H+L)抗体。

1.4.6 透射电镜下观察自噬小体的形成 收集各组细胞,用 2.5%戊二醛固定,随后加入 2%四氧化锇,梯度酒精脱水,环氧树脂包埋。树脂标本进行超薄切片(60 nm),染色后置于透射电子显微镜下观察自噬小体的形态以及聚集情况。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析。数据采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。对于 3 组或多组间平均值比较,使用单因素方差分析法,组间差异使用多重比较 SNK 法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 BMSCs 培养及鉴定

显微镜下观察第 3 代 BMSCs,细胞形态呈纺锤形或长梭形,排列紧密有序。流式细胞仪结果表明 90%以上细胞阴性表达 CD34 和 CD45(图 1A),阳性表达 CD29 和 CD44(图 1B),证实为间充质干细胞而非造血干细胞。

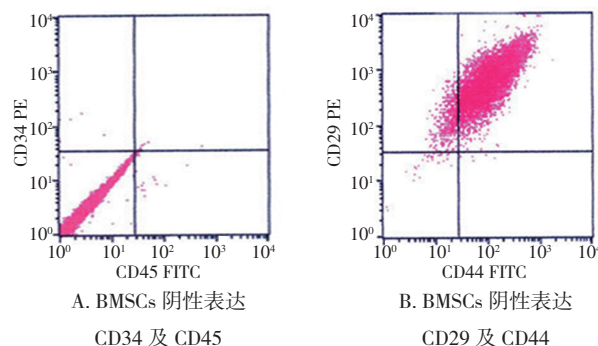
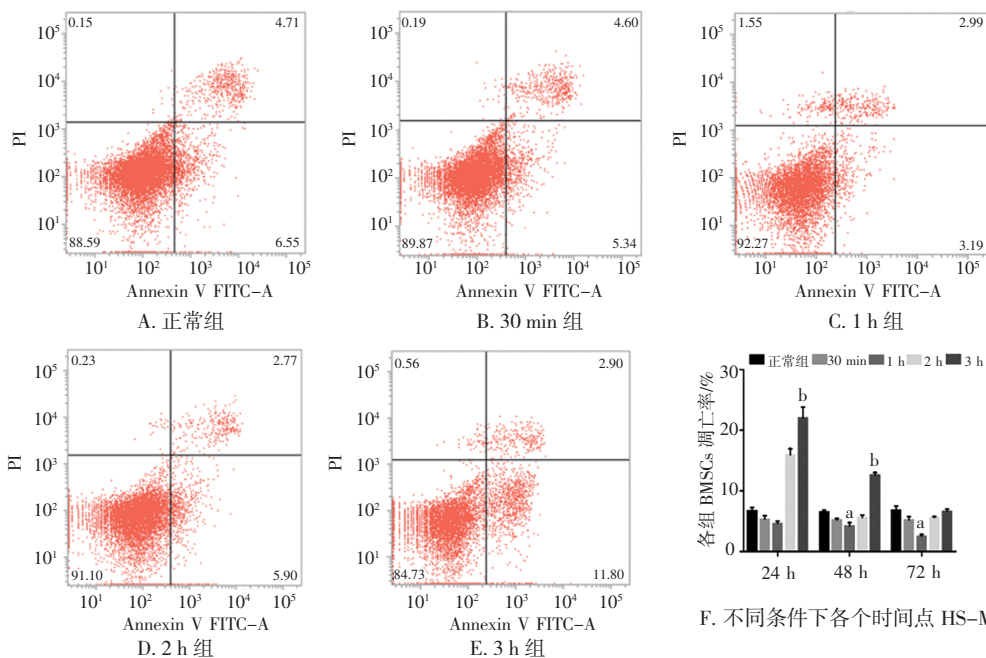


图 1 流式细胞仪检测 BMSCs 表面标记分子

2.2 热休克预处理的最佳条件

各组 BMSCs 在不同热休克处理条件及不同时间点的凋亡率,组间使用单因素方差分析有统计学差异($F_{24h}=29.408$, $P_{24h}=0.000$; $F_{48h}=39.206$, $P_{48h}=0.000$; $F_{72h}=4.884$, $P_{72h}=0.010$)。在热休克预处理后 24 h、48 h 和 72 h 后,与同时时间点的空白组相比,30 min 组、1 h 组和 2 h 组和 3 h 组的细胞凋亡率均有所下降。其中,1 h 组的凋亡率下降尤为明显,与其余 4 组相比均有统计学差异(图 2)。综上,热休克最佳预处理条件为 42℃、1 h。



F. 不同条件下各个时间点 HS-MSCs 凋亡率($\%, \bar{x} \pm s, n=45$)

注:a, 1 h 组与其余 4 组对比, $P < 0.05$; b: 3 h 组与其余 4 组相比, $P < 0.05$

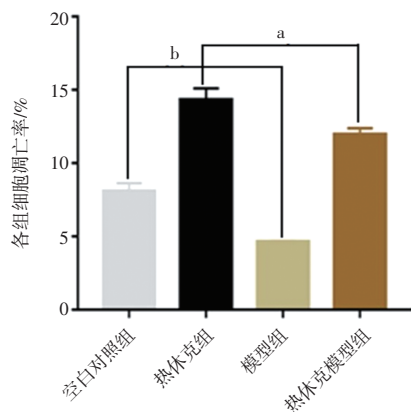
图 2 确定热休克预处理最佳处理条件

2.3 热休克预处理对 BMSCs 生物学特性的影响

2.3.1 CCK-8 检测细胞增殖能力 4 组细胞在 72 h 前细胞增殖速率均加快,随着培养时间的增加,增殖速率趋于平稳。其中,与其余 3 组相比,热休克组在检测第 2 天(d2)、第 3 天(d3)细胞增殖速率明显上升($t_{d2}=29.198, P_{d2}=0.000; t_{d3}=33.686, P_{d3}=0.000$)。

2.3.2 流式细胞仪检测细胞凋亡率 热休克组凋亡率 $[(4.62 \pm 0.08)\%]$ 明显低于空白对照组 $[(8.08 \pm 0.44)\%]$, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。热休克模型组凋亡率 $[(11.94 \pm 0.63)\%]$ 明显低于模型组 $[(14.30 \pm 0.80)\%]$, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 3A)。

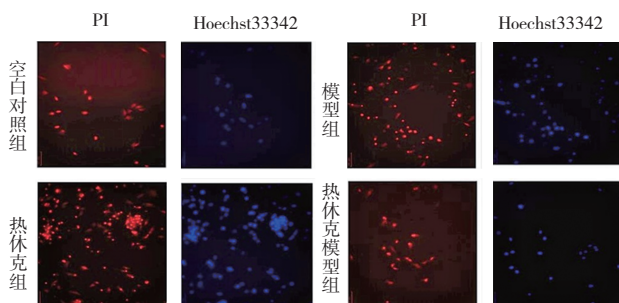
2.3.3 Hoechst33342/PI 测定细胞存活率 Hoechst33342/PI 双染后,热休克组细胞呈现高蓝/低红荧光(凋亡)比例较空白对照组少。同时,热休克模型组呈现高蓝/低红荧光比例(凋亡)亦较模型组少,此结果与流式细胞仪一致(图 3B)。



注:a,热休克模型组与模型组对比有统计学差异, $P < 0.05$;

b:模型组与正常组比较, $P < 0.05$

A. 流式细胞仪检查各组 BMSCs 凋亡率 ($\bar{x} \pm s, n=12$)



B. Hoechst33342/PI 检测各组 BMSCs 存活率 ($40 \times$)

图 3 HS-MSCs 凋亡率及存活率改变

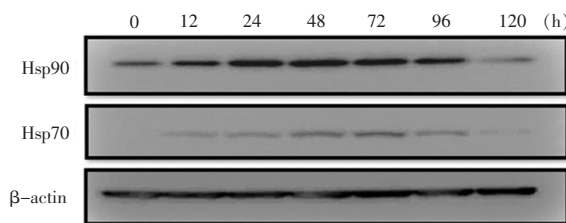
2.4 Western blot 检测 Hsp70 和 Hsp90 的表达

在热休克预处理后 0 h、12 h、24 h 和 48 h, Hsp70 和 Hsp90 的表达水平随培养时间增加而增加,并在 48 h 达高峰。随后 Hsp70 和 Hsp90 的表达水平逐渐下降,在 120 h 与正常细胞无明显差异(图 4A)。

2.5 自噬检测

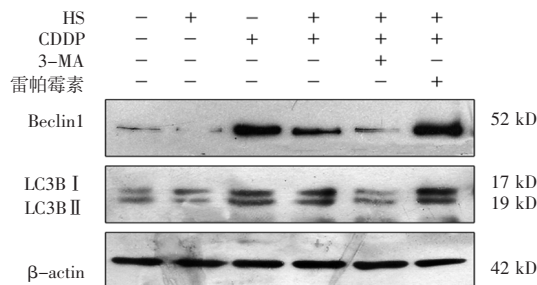
2.5.1 Western blot 检测 Beclin1 和 LC3B 蛋白水平 热休克组 Beclin1 蛋白表达较空白组减少,且 LC3B II/LC3B I 比值降低。模型组 Beclin1 蛋白表达较空白组增加,LC3B II/LC3B I 比值升高;与热休克模型组相比,其 Beclin1 蛋白表达减少,LC3B II/LC3B I 比值降低。加入自噬抑制剂 3-MA 后,Beclin1 蛋白表达较热休克模型组减少,LC3B II/LC3B I 比值降低。而加入自噬启动子雷帕霉素后,Beclin1 蛋白表达则较热休克模型组增加,LC3B II/LC3B I 比值升高(图 4B)。

2.5.2 电子透射显微镜观察自噬小体数量 在电子透射显微镜下观察各组自噬小体的数量,模型组自噬小体数量较空白组明显增加。然而,经热休克处理后,热休克模型组的自噬小体较模型组减少,其趋势与自噬水平变化一致(图 5)。



A. Western blot 检测不同时间点 HS-MSCs 中

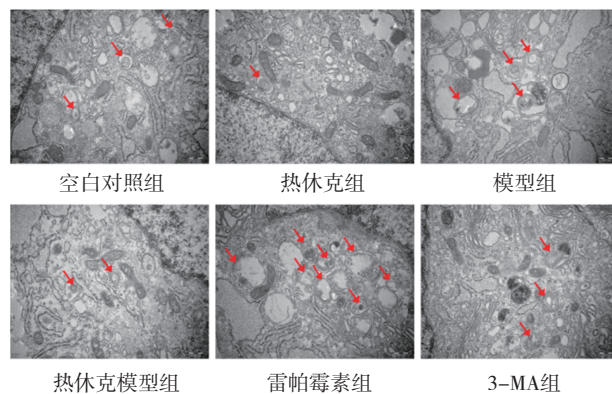
Hsp70 和 Hsp90 水平



B. Western blot 检测不同时间点 HS-MSCs 中

Beclin1 和 LC3B 蛋白水平

图 4 不同时间点 HS-MSCs 热休克蛋白及自噬相关标志物水平



注:红色箭头表示双层膜的液泡消化细胞器或胞质内容物

图 5 电子透射显微镜下观察各组细胞内自噬小体的数量

3 讨论

现今尚无有效手段能够完全抑制化疗药物诱导的卵母细胞和颗粒细胞凋亡^[15-16],从而达到治愈化疗性 POI 的目的。BMSCs 能够部分改善化疗损伤的卵巢结构及功能,但仍不能使其恢复至正常水平^[17],这可能与 BMSCs 移植后存活率下降、凋亡率增高密切相关^[18]。因此,提高 BMSCs 在化疗微环境中的存活能力对改善其在化疗性 POI 中的治疗效果至关重要。

HSP 可以诱导一种保守的热休克反应,保护生物体免受伤害。Omori H 等^[19]研究了热休克对小鼠胚胎干细胞来源神经干细胞的影响。发现经过 HSP 后(42 °C, 20 min),热休克蛋白基因表达、细胞存活力和增殖略有增加。Qiao PF 等^[14]证实 HSP(42 °C, 2 h)可使 BMSCs 细胞凋亡率明显降低。与此同时,抗凋亡蛋白 Bax 和细胞色素 C 表达下调、促凋亡蛋白 Bcl-2 表达上调。综上,HSP 能有效改善干细胞存活力,但不同来源干细胞的 HSP 最佳条件存在差异。

本课题组前期预实验已确定大鼠 BMSCs 的最佳 HSP 温度为 42 °C。本实验设置不同处理时间,进一步探索 HSP 最佳条件。结果显示,42 °C 处理 1 h 的大鼠 BMSCs 凋亡率明显低于处理 30 min、2 h 和 3 h。接下来验证在顺铂模拟的化疗微环境下,HSP 对大鼠 BMSCs 生物学特性的影响。结果表明,与空白组 BMSCs 相比,热休克组细胞增殖率、存活率及抗凋亡能力均明显增加。此外,热休克模型组的细胞增殖率、存活率及抗凋亡能力亦较模型组明显增加。因此,HSP 不仅能够提高正常培养环境下的大鼠 BMSCs 存活力,还能有效改善化疗微环境下大鼠 BMSCs 的存活力,抑制其凋亡。然而,有研究提出 HSP 可能对 MSCs 的正常发育和增殖有损害作用,进而影响 MSCs 的寿命。Shimoni C 等^[20]发现 HSP(42 °C, 1 h)诱导牛脐带 MSCs 发生应激性早衰,导致线粒体损伤和氧化应激,从而明显降低其正常增殖和分化能力。这种应激性早衰的发生可能与牛对外界恶劣的温度非常敏感有关。另外,亚致死性 HSP(45 °C, 30 min)的人 MSCs 亦表现出不可逆的细胞周期阻滞、形态改变、衰老相关 β -半乳糖苷酶(SA- β -gal)活性表达、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 p21 蛋白增加,诱导细胞过早衰老^[21]。本实验

及前期实验通过设置不同处理温度和时间,确认大鼠 BMSCs 的 HSP 最佳条件,避免温度过高或处理时间过久导致的细胞死亡和早衰。

Hsp 是一种普遍存在于活细胞内、受多种应激反应诱导表达的蛋白,通过帮助细胞蛋白的正确折叠保护细胞免受损伤^[12]。有研究证明,Hsp90 通过 TLR-4 和 MyD88 连接蛋白激活 PI3K/Akt 和 ERK1/2 通路,促进下游 NO 的合成,从而对 MSCs 起到抗凋亡作用^[22-23]。而 Hsp70 则通过与细胞凋亡诱导因子(apoptosis inducing factor, AIF)相互作用阻断 caspase 凋亡通路^[24]。此外,在体外和体内实验中,顺铂治疗均可导致 MSCs 中的 Hsp90 和 Hsp70 水平增加,提示热休克蛋白可能参与 MSCs 对顺铂的耐药^[25]。本实验结果显示,Hsp70 和 Hsp90 的表达在 HSP 后即开始上调,并随时间逐渐增加,到 48 h 达峰值,随后逐渐下降,至 120 h 基本回到处理前水平。Zhang M 等^[26]发现,MSCs 的凋亡和坏死多发生于移植后 96 h 内。因此,HSP 可能通过增加 BMSCs 内热休克蛋白水平改善其存活力,并且此细胞保护效应可维持约 120 h。

新近研究表明,细胞自噬也可能参与热休克抗凋亡的相关机制^[27-29]。Qiao PF 等^[14]证实,BMSCs 经过 2 h 的 HSP 后自噬水平增强,自噬相关蛋白 Beclin1 和 LC3-II 表达增加以及自噬小体数量增多。在 H₂O₂ 诱导的大鼠心肌缺血再灌注模型中,热休克通过 p38MAPK/mTOR 途径有效诱导自噬,从而提高间充质干细胞的存活率和修复能力。本实验结果显示,热休克模型组的 BMSCs 内自噬相关蛋白 Beclin1 和 LC3-II 表达下降、自噬小体数量减少。加入 3-MA 后,Beclin1 蛋白表达较热休克模型组减少,LC3B II / LC3B I 比值进一步降低。而加入自噬启动子雷帕霉素后,Beclin1 蛋白表达则较热休克模型组增加,LC3B II / LC3B I 比值升高,说明在顺铂模拟的化疗微环境下 HSP 抑制 BMSCs 发生自噬。本实验结果与 Qiao PF 等^[14]的实验结果相反,这与 HSP 对自噬的影响较为复杂有关。在不同细胞模型或条件下,HSP 可能诱导自噬的发生,也可能抑制自噬。目前,涉及化疗微环境下 HSP 与 BMSCs 自噬的相关性研究较少,且 HSP 对自噬的具体调控机制尚未阐明,本实验将为后续机制探索提供理论基础。

综上所述,本研究证实了 HSP 有效抑制化疗微环境下 BMSCs 凋亡、提高 BMSCs 增殖能力及存活

率,其机制可能与 Hsp70 和 Hsp90 的表达增加、自噬水平下降密切相关。

参 考 文 献

- [1] Yang L,Zheng R,Wang N,et al. Incidence and mortality of stomach cancer in China,2014[J]. Chin J Cancer Res,2018,30(3):291–298.
- [2] Hoyer PB,Sipes IG. Assessment of follicle destruction in chemical-induced ovarian toxicity[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol,1996,36:307–331.
- [3] Zheng Q,Fu X,Jiang J,et al. Umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation prevents chemotherapy-induced ovarian failure via the NGF/TrkA pathway in rats[J]. Biomed Res Int,2019,2019:6539294.
- [4] Sherman LS,Romagano MP,Williams SF,et al. Mesenchymal stem cell therapies in brain disease[J]. Semin Cell Dev Biol,2019,95:111–119.
- [5] Yan L,Wu Y,Li L,et al. Clinical analysis of human umbilical cord mesenchymal stem cell allotransplantation in patients with premature ovarian insufficiency[J]. Cell Prolif,2020,53(12):e12938.
- [6] Godwin EE,Young NJ,Dudhia J,et al. Implantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells demonstrates improved outcome in horses with overstrain injury of the superficial digital flexor tendon[J]. Equine Vet J,2012,44(1):25–32.
- [7] Abreu SC,Antunes MA,Xisto DG,et al. Bone marrow,adipose,and lung tissue-derived murine mesenchymal stromal cells release different mediators and differentially affect airway and lung parenchyma in experimental asthma[J]. Stem Cells Transl Med,2017,6(6):1557–1567.
- [8] Eggenhofer E,Benseler V,Kroemer A,et al. Mesenchymal stem cells are short-lived and do not migrate beyond the lungs after intravenous infusion[J]. Front Immunol,2012,3:297–304.
- [9] Li Q,Wang Y,Deng Z. Pre-conditioned mesenchymal stem cells: a better way for cell-based therapy[J]. Stem Cell Res Ther,2013,4(3):63–65.
- [10] Silva LHA,Antunes MA,Dos Santos CC,et al. Strategies to improve the therapeutic effects of mesenchymal stromal cells in respiratory diseases[J]. Stem Cell Res Ther,2018,9(1):45–53.
- [11] Kim WK,Kim WH,Kweon OK,et al. Intravenous administration of heat shock-treated MSCs can improve neuroprotection and neuroregeneration in canine spinal cord injury model[J]. Animals(Basel),2020,10(11):2164–2179.
- [12] Jacob P,Hirt H,Bendahmane A. The heat-shock protein/chaperone network and multiple stress resistance[J]. Plant Biotechnol J,2017,15(4):405–414.
- [13] Jin C,Zhou F,Zhang L,et al. Overexpression of heat shock protein 70 enhanced mesenchymal stem cell treatment efficacy in phosphate-induced acute lung injury[J]. J Biochem Mol Toxicol,2020,34(8):e22515.
- [14] Qiao PF,Yao L,Zhang XC,et al. Heat shock pretreatment improves stem cell repair following ischemia-reperfusion injury via autophagy[J]. World J Gastroenterol,2015,21(45):12822–12834.
- [15] Nguyen QN,Zerafa N,Liew SH,et al. Cisplatin- and cyclophosphamide-induced primordial follicle depletion is caused by direct damage to oocytes[J]. Mol Hum Reprod,2019,25(8):433–444.
- [16] Spears N,Lopes F,Stefansdottir A,et al. Ovarian damage from chemotherapy and current approaches to its protection[J]. Hum Reprod Update,2019,25(6):673–693.
- [17] Fu X,He Y,Xie C,et al. Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation improves ovarian function and structure in rats with chemotherapy-induced ovarian damage[J]. Cytotherapy,2008,10(4):353–363.
- [18] Zhang M,Methot D,Poppa V,et al. Cardiomyocyte grafting for cardiac repair:graft cell death and anti-death strategies[J]. J Mol Cell Cardiol,2001,33(5):907–921.
- [19] Omori H,Otsu M,Suzuki A,et al. Effects of heat shock on survival, proliferation and differentiation of mouse neural stem cells[J]. Neurosci Res,2014,79:13–21.
- [20] Shimoni C,Goldstein M,Ribarski-Chorev I,et al. Heat shock alters mesenchymal stem cell identity and induces premature senescence[J]. Front Cell Dev Biol,2020,8:565970.
- [21] Alekseenko LL,Zemelko VI,Domnina AP,et al. Sublethal heat shock induces premature senescence rather than apoptosis in human mesenchymal stem cells[J]. Cell Stress Chaperones,2014,19(3):355–366.
- [22] Quentzel HL,Nadelman RB,Ng J,et al. SI units and the clinical practice of infectious diseases:application to the usage of antimicrobial agents[J]. Rev Infect Dis,1989,11(1):122–127.
- [23] Sart S, Ma T,Li Y. Preconditioning stem cells for *in vivo* delivery[J]. Biores Open Access,2014,3(4):137–149.
- [24] Tutar L,Tutar Y. Heat shock proteins:an overview[J]. Curr Pharm Biotechnol,2010,11(2):216–222.
- [25] Nicolay NH,Perez RL,Rühle A,et al. Mesenchymal stem cells maintain their defining stem cell characteristics after treatment with cisplatin[J]. Sci Rep,2016,6:20035.
- [26] Zhang M,Methot D,Poppa V,et al. Cardiomyocyte grafting for cardiac repair:graft cell death and anti-death strategies[J]. J Mol Cell Cardiol,2001,33(5):907–921.
- [27] Han J,Xu X,Qin H,et al. The molecular mechanism and potential role of heat shock-induced p53 protein accumulation[J]. Mol Cell Biochem,2013,378(1–2):161–169.
- [28] Penke B,Bogar F,Crul T,et al. Heat shock proteins and autophagy pathways in neuroprotection:from molecular bases to pharmacological interventions[J]. Int J Mol Sci,2018,19(1):325–364.
- [29] Dokladny K,Myers OB,Moseley PL. Heat shock response and autophagy:cooperation and control[J]. Autophagy,2015,11(2):200–213.

(责任编辑:冉明会)