

• 论 著 •

克隆化的人骨髓间充质干细胞系的建立及其生物学特性的研究

陶欣荣¹,李文林¹,苏娟¹,王新民¹,李建秀¹,Joseph T Lau²,胡以平^{1*}

(1. 第二军医大学基础医学部细胞生物学教研室,上海 200433; 2. The Department of Molecular and Cellular Biology, Roswell Park Cancer Institute, Elm and Carlton Streets, Buffalo, NY 14263, USA)

[摘要] **目的:**分离人骨髓间充质干细胞(hMSCs),建立克隆化扩增的细胞系并初步鉴定其分化特性和细胞的分子标记。**方法:**利用间充质干细胞贴壁生长的特性,显微镜下挑取原代单个成纤维样生长单位中的细胞,逐步扩大培养,最终得到克隆化扩增的hMSCs。选择有利于其生长的血清,低密度培养,传70%~80%生长汇合时传代保种。RT-PCR检测其Oct-4、SDF-1、CD49a、CK19、c-met基因的表达;流式细胞术检测细胞表面抗原CD34、CD45、CD14、CD44、CD29、CD90、HLA-1和HLA-DR;体外向骨、软骨、脂肪细胞方向诱导分化鉴定其分化潜能。**结果:**建立了人骨髓间充质干细胞系并在体外实现了克隆化扩增,该细胞系在体外连续培养达60个细胞倍增时间仍保持多向分化的潜能。细胞不表达CD34、CD45、CD14、HLA-DR,但表达Oct-4、SDF-1、CD49a、CK19、c-met、CD44、CD29、CD90、HLA-1。体外能诱导出骨、软骨、脂肪细胞。**结论:**得到了一个可稳定传代的克隆化扩增的人骨髓间充质干细胞系,该细胞系在体外可以分化为骨、软骨、脂肪细胞,并表达Oct-4、CK19和c-met。

[关键词] 间充质干细胞;骨髓;细胞系;克隆;细胞分化

[中图分类号] Q 813.11 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2005)03-0257-06

Establishment and characterization of clonal human mesenchymal stem cell line from bone marrow

TAO Xin-rong¹, LI Wen-lin¹, SU Juan¹, WANG Xin-min¹, LI Jian-xiu, Joseph T Lau², HU Yi-ping^{1*} (Department of Cell Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. The Department of Molecular and Cellular Biology, Roswell Park Cancer Institute, Elm and Carlton Streets, Buffalo, NY 14263, USA)

[ABSTRACT] **Objective:** To isolate human mesenchymal stem cells (hMSCs) from bone marrow, establish clonal hMSCs cell lines from these isolated primary cells, and characterize these hMSCs cell lines. **Methods:** hMSCs were isolated from human bone marrow by taking advantage of their preferential adherence to the plastic surface of the culture dish. Individual clones of clonogenic cells were picked with sterile pipette tips under microscope. Undifferentiated hMSCs were maintained by using low density culture with selected fetal bovine serum. The cells were passaged when they grew to 70%-80% confluency. The expression of gene markers (Oct-4, SDF-1, CD49a, CK19, and c-met) was analyzed by RT-PCR; the expression of cell surface antigens (CD34, CD45, CD14, CD44, CD29, CD90, HLA-1, and HLA-DR) was assessed by Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS); *in vitro* differentiation assay was carried out to assess the multi-lineage potential (osteoblast, chondrocyte and adipocyte lineage) of these cells and cell lines. **Results:** Clonal cell lines of hMSCs were successfully isolated from human bone marrow. The isolated hMSCs maintained their stem cell characteristics even after *in vitro* culture over 60PD. Oct-4, SDF-1, CD49a, CK19, c-met, CD44, CD29, CD90, and HLA-1 were expressed while CD34, CD45, CD14, and HLA-DR were not expressed. These hMSCs differentiated into 3 different types of mesenchymal lineage: osteogenic cells, adipogenic cells and chondrogenic cells. **Conclusion:** Clonal expansions of hMSCs have been successfully carried out. These cell lines have hMSCs phenotype (can be induced to differentiate into the osteoblasts, chondrocytes, and adipocytes) and express Oct-4, CK19 and c-met genes.

[KEY WORDS] mesenchymal stem cells; bone marrow; cell line; clone; cell differentiation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2005, 26(3): 257-262]

人间充质干细胞(human mesenchymal stem cells, hMSCs)的组织来源很多,但是从组织中 hMSCs 的含量、取材的方便程度,分离扩增后可以紧接着用于细胞移植的角度,我们认为骨髓是 hMSCs 将来临床应用最好的来源。骨髓中 hMSCs 亚系在形态、分化潜能、细胞移植后的归巢能力上不

同^[1~3]。另外,不同的分离方法与培养条件,对多潜

[基金项目] 国家自然科学基金(30470876, 30270668, 30270603, 30200138);上海市科委重大项目(03DJ14020)。

[作者简介] 陶欣荣(1968-),女(汉族),博士,副教授。

* Corresponding author. E-mail: yphu@smmu.edu.cn

能 hMSCs 的获得与维持也非常重要。因此,分离骨髓中的 hMSCs 亚系、纯化扩增并对其分化潜能和细胞的分子特征做鉴定非常有意义。

对 hMSCs 的研究发现低密度种植和传代培养可以维持其快速增殖、提高产量,最大限度地保持其多向分化潜能的干细胞特性^[4]。进一步研究发现,hMSCs 在无血清条件下培养,Oct-4 表达增强^[2]。美明尼苏达州 Verfaillie 研究小组的实验结果也显示人骨髓中存在多潜能的干细胞 MAPCs^[5],但 MAPCs 的分离与培养的条件比较特殊,与 hMSCs 之间的关系还不清楚。本实验利用 hMSCs 贴壁生长的特性,挑取原代最早出现和较大的来源于单个细胞的成纤维克隆样生长单位(colony-forming units-fibroblastic,CFU-Fs)中的细胞^[6],逐步扩大培养,进行克隆化扩增,对细胞的特征和分化潜能的鉴定证明了人骨髓多潜能干细胞的存在。

1 材料和方法

1.1 主要材料 人骨髓来源于正常女性与男性志愿者(17~60岁),从髂后上嵴抽取 10 ml 肝素抗凝的骨髓。DMEM-LG、DMEM-HG、0.5% Trpsin 含 5.3 mmol/L EDTA(10×)(Gibco);FBS (Hyclone);维生素 C、地塞米松、β-甘油磷酸、胰岛素、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMx)、吲哚美辛、胰岛素-转铁蛋白-亚硒酸钠(ITS)、油红-O、茜素红-S (Sigma);TGF-β₁ (Peprotech);BCIP/NBT(华舜生物技术有限公司产品);碱性甲苯胺蓝(上海试剂三厂)。TRIzol 总 RNA 抽提试剂盒(上海生工生物工程技术服务有限公司);RT-PCR 试剂盒(上海申能博采生物技术公司);引物合成(上海生工生物工程技术服务有限公司);兔抗人 I 型胶原抗体、兔抗人 II 型胶原抗体。荧光抗体 CD34-FITC、CD45-FITC、CD90-FITC、CD44-FITC、HLA-1-FITC、CD14-PE、CD29-PE、HLA-DR-PE(晶美生物公司产品)。红细胞裂解液(自配)。

1.2 直接法分离 hMSC 的原代与传代培养 骨髓 5 ml 置于 10 ml 离心管,加入 5 ml PBS,900×g,15 min,弃上清与脂肪,加 PBS 再以同样方法洗 2 次。加入等量红细胞裂解液,4℃,5 min,在血细胞计数板中对有核细胞计数,过 4 号针头后以 1×10⁴/cm² 有核细胞接种于含有 DMEM-LG,10% FBS,2 mmol/L 谷氨酰胺,青、链霉素(100 μg/ml)的 100 mm 的培养皿里。24 h 后换液,PBS 冲洗 3 遍,换新鲜培养液,CO₂ 恒温培养箱(饱和湿度,5% CO₂,37℃)内继续培养,隔天换液。24 h 内有些贴壁的

细胞已开始分裂。每天仔细观察并标记,6 d 后已形成分散的 30~200 个细胞的克隆,标记较早出现且较大的细胞克隆,14 d 后细胞生长至 70%~80% 汇合,显微镜下挑取单个 CFU-Fs 中的细胞为原代,放于 24 孔板,Trypsin-EDTA 消化成单细胞悬液,以 50/cm² 的密度种植,生长至 70%~80% 汇合后胰酶消化,逐步扩大培养并冻存保种(每 ml 冻存液含 1×10⁶ 个细胞,70% DMEM-LG,20% FBS,10% DMSO 放于液氮),部分细胞备鉴定。

1.3 细胞生长曲线测定 取第 8 代的细胞,以 50/cm² 的密度种植于 24 孔板,每天定时收集 3 孔细胞并记数,共测 7 d,绘制生长曲线。

1.4 细胞的分子特征

1.4.1 流式细胞仪分析 细胞扩增 40 个倍增时间(population doubling, PD)时,Trypsin-EDTA 消化,取约 10⁵~10⁶ 细胞,分别按抗体说明书加入相应检测量的荧光标记抗体(CD34-FITC, CD45-FITC, CD90-FITC, CD44-FITC, HLA-1-FITC; CD14-PE, CD29-PE, HLA-DR-PE)和相应的同型对照抗体,混匀,室温避光放置 20 min。加入 2 ml PBS,1 000×g 离心 5 min,弃上清,加入 300 μl PBS 重悬细胞。流式细胞仪检测,以 Cellquest 软件获取细胞,分析阳性细胞百分比。

1.4.2 RT-PCR 检测 分别抽取细胞扩增 25、36、48 PD 时的总 RNA,分光光度计测抽提的 RNA 纯度与量,按 RT-PCR 试剂盒说明书合成 cDNA。RT-PCR 分别扩增 Oct-4(247 bp)上游引物 5'-CGT GAA GCT GGA GAA GGA GAA GCT G-3';下游引物 5'-CAA GGG CCG CAG CTT ACA CAT GTT C-3'。CD49a(550 bp)上游引物 5'-CTG CTA CTG CTT CTT CTG GAG-3';下游引物 5'-CCA CCT GAT GGA ATA CGT TGT GC-3'。c-met(328 bp)上游引物 5'-GGG TCG CTT CAT GCA GGT TGT GGT -3';下游引物 5'-ATG GTC AGC CTT GTC CCT CCT TCA-3'。SDF-1(202 bp)上游引物 5'-ATG AAC GCC AAG GTC GTG GTC G-3';下游引物 5'-TGT TGT TGT TCT TCA GCC G-3'。CK19(746 bp)上游引物 5'-TCC CGC GAC TAC AGC CAC TAC TAC ACG ACC -3';下游引物 5'-CGC GAC TTG ATG TCC ATG AGC CGC TGG TAC -3'。β-actin(516 bp)上游引物 5'-GCA CTC TTC CAG CCT TCC TTC C-3';下游引物 5'-TCA CCT TCA CCG TTC CAG TTT TT-3'。

1.5 hMSCs 体外分化潜能鉴定

1.5.1 向成骨细胞诱导 将纯化扩增的 35~60 PD 细胞以 $5 \times 10^3/\text{cm}^2$ 的密度接种于 6 个 60 mm 小皿内(其中 4 个皿里放有盖玻片,设处理组与对照组),待细胞长至 60% 汇合时,处理组换成骨诱导培养液(含 10^{-7} mol/L 地塞米松, 0.2 mmol/L 维生素 C, 10 mmol/L β -甘油磷酸, 10% FBS, DMEM-LG) 继续培养。每 3 d 换液培养至 7、14、21 d 时取细胞飞片和抽提 RNA。BCIP/NBT 分析 hMSCs 分化中碱性磷酸酶的表达。茜素红-S 染色显示形成的骨细胞外基质中的矿化钙, RT-PCR 分析 hMSCs 向骨细胞分化过程中 osteopontin 基因的表达。

1.5.2 向脂肪细胞诱导 将纯化扩增的细胞以 $2 \times 10^4/\text{cm}^2$ 的密度接种于 4 个 60 mm 小皿内(其中 2 个皿里放有盖玻片),待细胞长至 100% 汇合时,再培养 3 d,换脂肪诱导培养液,按文献^[7]方法采用诱导/维持培养液,3+2 方案,3 个轮回,再用维持培养液继续培养 3 d。即脂肪诱导培养液(1 $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松, 0.5 mmol/L IBMX, 0.2 mmol/L 吡啶美辛, 10 $\mu\text{g/ml}$ 胰岛素, 10% FBS, DMEM-HG), 3 d; 脂肪维持培养液(10 $\mu\text{g/ml}$ 胰岛素, 10% FBS, DMEM-HG), 2 d; 最后换维持培养液再继续培养 3 d。细胞飞片取出后, PBS 洗 2 次, 中性甲醛固定 10 min, PBS 洗, 油红-O 染色 10 min。RT-PCR 分析 hMSCs 向脂肪细胞分化过程中转录因子 PPAR γ 2 的表达。

1.5.3 向软骨细胞诱导 使用三维培养体系(2.5×10^5 , 2 000 r/min, 6 min, 0.5 ml 培养液于 15 ml 离心管,使细胞沉淀于管底,用平、粗的吸管头把细胞团套下,使其飘浮),换软骨诱导培养液(10 ng/ml TGF- β_1 , 10 ng/ml ITS, 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松; 1 mmol/L 丙酮酸钠; DMEM-HG 培养液), 悬松 15 ml 离心管的盖子放于 37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO $_2$ 恒温培养箱中, 3 d 换液, 并振荡使其漂浮, 培养 21 d。冰冻切片, 6 μm 厚。碱性甲苯胺蓝染色显示软骨细胞外基质中带负电荷的蛋白多糖, 免疫组化分析软骨细胞

外基质中 II 型胶原, RT-PCR 分析 hMSCs 向软骨细胞分化过程中细胞外基质 aggrecan 合成的基因表达。

1.5.4 RT-PCR 鉴定 抽取诱导前与诱导中不同时间点的总 RNA, 分光光度计测抽提的 RNA 纯度与量。按 RT-PCR 试剂盒说明书合成 cDNA, RT-PCR 分别扩增 osteopontin (373 bp) 上游引物 5'-CTA GGC ATC ACC TGT GCC ATA CC-3'; 下游引物 5'-CAG TGA CCA GTT CAT CAG ATT CAT C-3'。PPAR γ 2 (351 bp) 上游引物 5'-GCT GTT ATG GGT GAA ACT CTG-3'; 下游引物 5'-ATA AGG TGG AGA TGC AGG CTC-3'。aggrecan (350 bp) 上游引物 5'-TGA GGA GGG CTG GAA CAA GTA CC-3'; 下游引物 5'-GGA GGT GGT AAT TGC AGG GAA CA-3'。

2 结果

2.1 hMSCs 细胞系的建立 利用 hMSCs 贴壁生长的特点, 挑取原代来源于单个 CFU-Fs 中的细胞, 以 $50/\text{cm}^2$ 的密度种植, 细胞生长汇合至 70%~80% 传代, 扩增后冻存保种。10% 的 FBS(经过筛选的)、DMEM-LG 培养条件下在体外经 60 PD, 生长状态都非常好, 立体感强, 有生长晕。细胞生长汇合达 100% 时为旋涡状或平行排列。细胞经液氮冻存 1 年后复苏, 仍保持良好的生长状态, 是稳定传代的细胞系。培养的原代骨髓细胞中 CFU-Fs 与其他细胞不同, 表现为贴壁生长, 梭形, 培养过程分裂和迁移, 单个的成纤维样细胞可以形成克隆样单位, 而造血系的细胞较小, 在相差显微镜下发亮。我们在原代以较低的密度种植, 仔细观察并标记来源于单个贴壁的成纤维样细胞, 挑取较早出现且较大的 CFU-Fs, 逐步扩大培养, 建立了单个细胞来源的 hMSCs 细胞系。相差显微镜下, hMSCs 是均一的小梭形细胞, 胰酶消化后细胞直径为 10~15 μm , 大而扁的细胞很少, 见图 1。

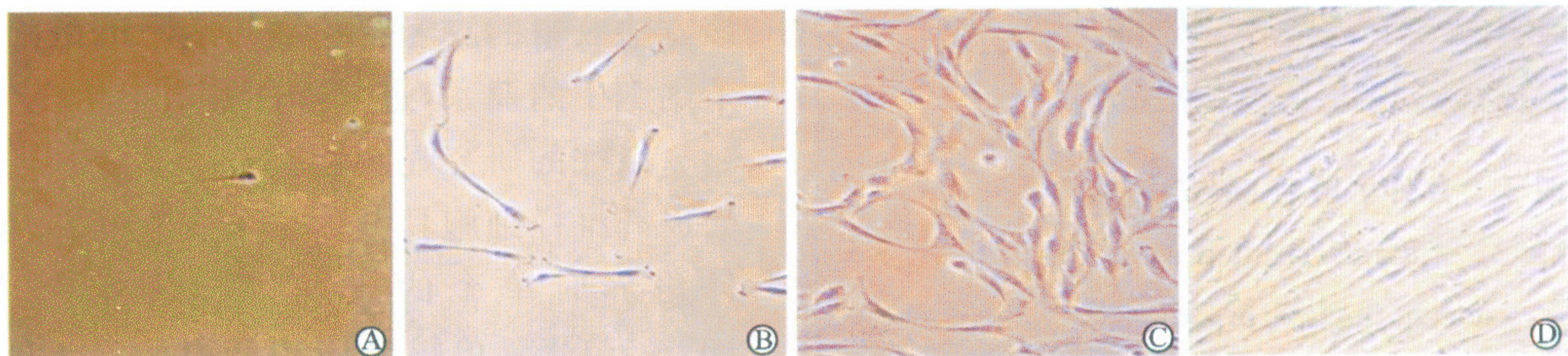


图 1 相差显微镜下 hMSCs 的形态

Fig 1 Morphology of hMSCs under phase-contrast microscope($\times 100$)

A: The appearance of single hMSC 2 d of the primary culture; B: The individual clone grew for 4 d; C: The individual clone grew for 6 d; D: 100% confluence after subculture, hMSCs were homogeneous shuttle-shape

2.2 细胞增殖特征 通过生长曲线(图2)计算,细胞倍增时间为 (29.5 ± 2.3) h。

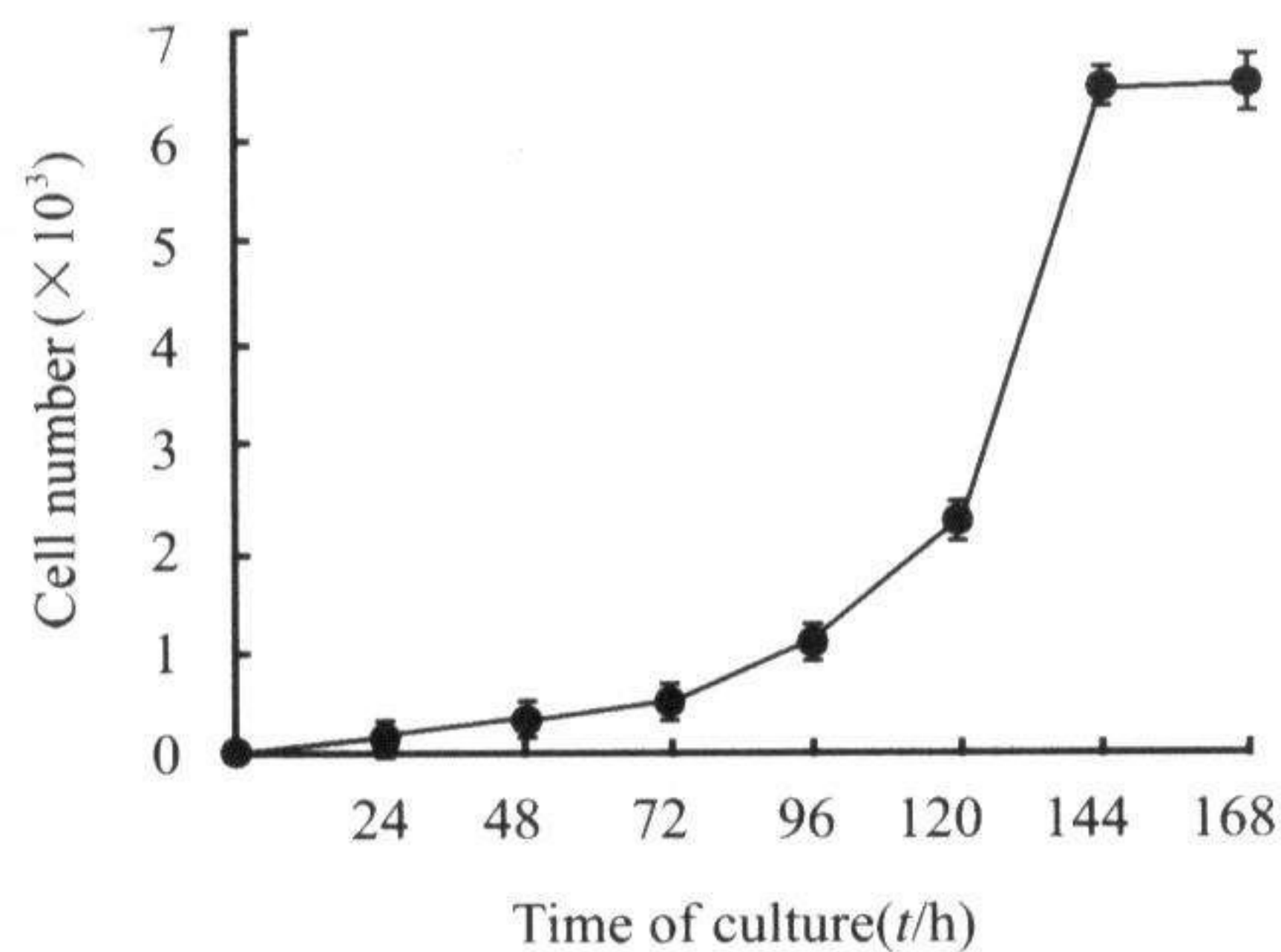


图2 细胞的生长曲线

Fig 2 Growth curve of hMSCs ($n=3, \bar{x} \pm s$)

2.3 细胞的分子标志 细胞不表达 CD34、CD45、CD14 和 HLA-DR; 表达 Oct-4、SDF-1、CD49a、c-met、CK19、CD44、CD29、CD90、HLA-1(1图3)。该细胞系以低密度传代保种,虽然扩增出的细胞中也出现较少的大、扁细胞,但各代次基因的表达无大差异。流式细胞仪检测的结果也显示培养的细胞大小非常均一,细胞表面抗原分子的表达也非常一致(图未显示)。

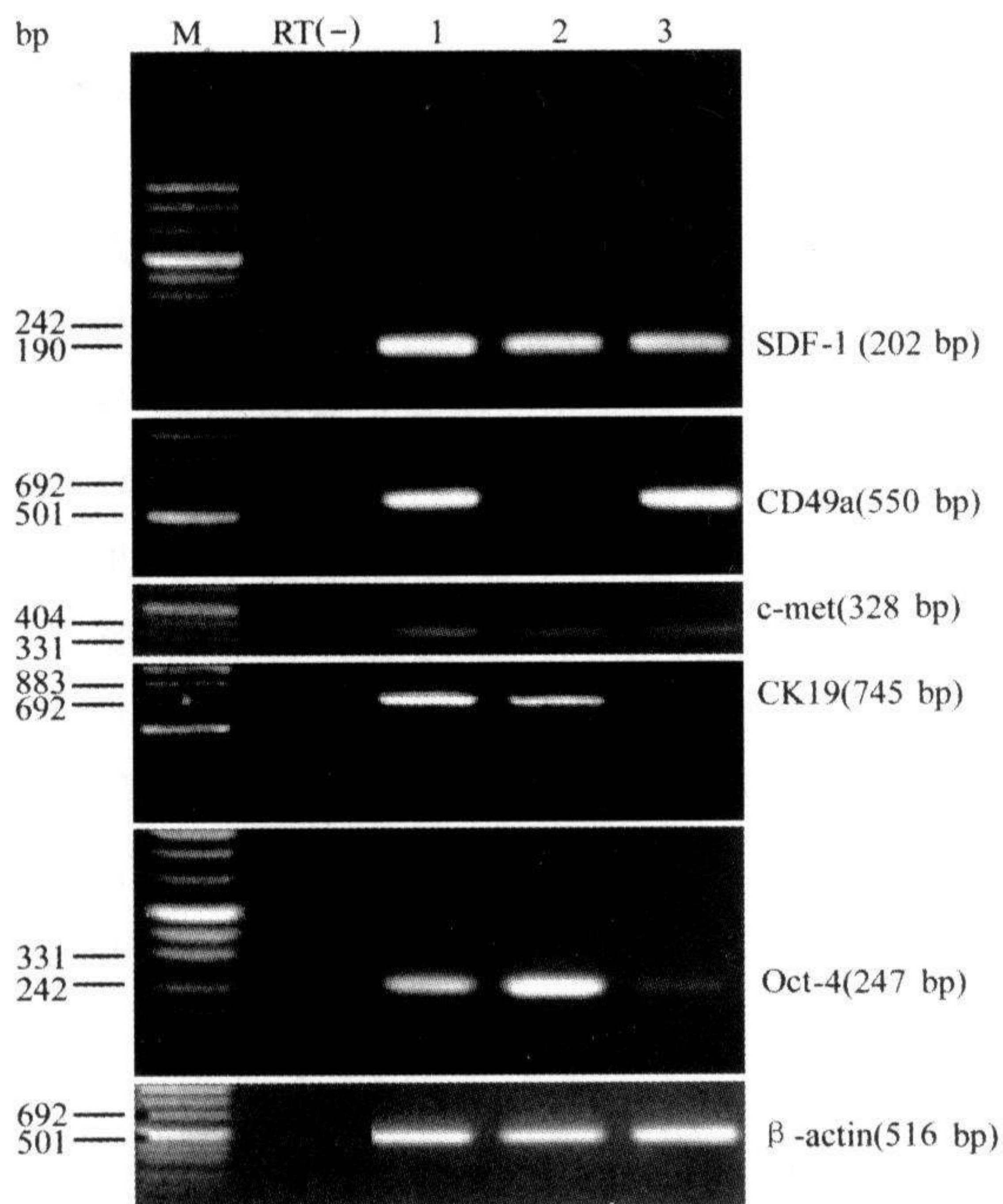


图3 体外扩增的hMSCs的鉴定

Fig 3 Characterization of hMSCs during *in vitro* procedure

RT-PCR analysis of the expression of SDF-1, CD49a, c-met, CK19, Oct-4. M: pUC Mix marker; 1: 25 PD; 2: 36 PD; 3: 48 PD. Complementary DNA are equalized for β -actin expression. RNA as negative control

2.4 体外分化潜能 体外诱导分化实验结果显示建立的 hMSCs 细胞系具向骨、软骨、脂肪细胞方向分化的潜能。hMSCs 在向骨细胞诱导条件下,早期就可以检测到碱性磷酸酶的表达,随着诱导时间的延长不断增强;免疫组织化学分析 I 型胶原为阳性;细胞化学方法染色显示细胞外基质中有钙化点;而对照组均为阴性。hMSCs 在本研究的实验条件下向脂肪细胞的分化比例高达 $(97.6 \pm 3.6)\%$ 。31 PD、60 PD 分别做的分化潜能实验结果无差异。在无血清培养,向软骨细胞分化的条件下,正常对照的细胞团第 2 天缩小,而加入 TGF- β_1 /ITS/地塞米松的诱导条件下,细胞团在第 3 天时体积最大,接下来体积无明显变化。碱性甲苯胺蓝染色显示细胞外基质中有氨基多糖;免疫组化结果 II 型胶原为阳性;对照组未检测到(图 4)。

3 讨论

不同实验室分离和体外扩增 hMSCs 的方法条件各不相同^[8~10],分离得到的 hMSCs 在分子表型与分化潜能也不一样,至今也没有统一的 hMSCs 特异的分子标志。因此,用来证明实验中得到的细胞是间充质干细胞的唯一金标准是其能向中胚层 3 种细胞(骨、软骨、脂肪细胞)分化。此外,骨髓来源的间充质干细胞还可以在体外分化为骨髓基质细胞、内皮细胞、成肌细胞、肝细胞和神经细胞^[11~13]。

我们采用直接法(利用 hMSCs 贴壁生长的特点)和密度梯度的方法(Percoll, 1.073 g/ml; Ficoll, 1.077 g/ml)分别分离 hMSCs,也建立了多个 hMSCs 细胞系。本次实验对用直接法、克隆化扩增建立的 hMSCs 细胞系做了进一步的研究,包括分化潜能研究和细胞特征鉴定。我们挑取原代最先出现的较大 CFU-Fs 中的细胞,以低密度传代保种,在经过筛选的 10% FBS 培养条件下,分化潜能实验证明单个成纤维克隆样生长单位里的细胞具有 3 向分化潜能,且这种多向分化的潜能可以维持达 60PD。该方法获得的克隆化扩增的细胞系很可能是间充质干细胞中的亚系,进一步的鉴定工作在进行。

以往的研究显示,骨髓、脐血、外周血和滑膜里的成纤维样细胞具分化为间充质类细胞的能力,体外培养时单个的成纤维样细胞形成 CFU-Fs。 $10^4 \sim 10^5$ 骨髓单核细胞中约有 1 个 CFU-Fs, CFU-Fs 克隆化扩增并对其特征进一步鉴定的实验研究很少^[6],它们与造血干细胞及其他干细胞之间的关系目前还清楚。

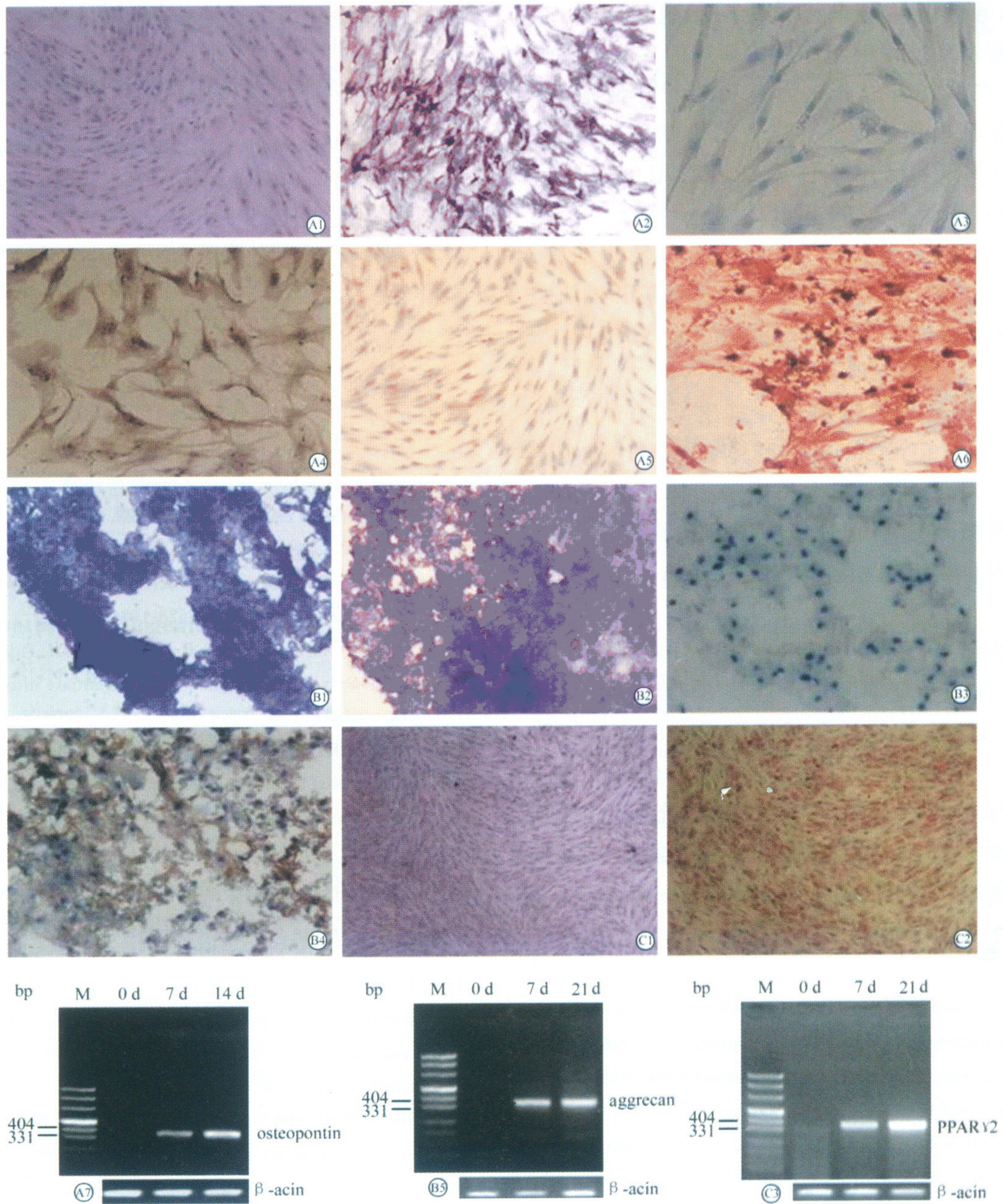


图 4 hMSCs 多向分化潜能

Fig 4 Multi-lineage differentiation of hMSCs

A1-A6 (100×): Osteogenic differentiation was demonstrated by alkaline phosphatase cytochemistry staining, type I collagen immunohistochemical staining, Alizarid Red-S staining and osteopontin gene expression(A7), A1, A3 and A5 are taken as control(without inducement); B1-B4 (400×): Chondrogenic differentiation was demonstrated by toluidine blue staining, type II collagen immunohistochemical staining of pellet section and aggrecan expression(B5). B1 and B3 are taken as control(without inducement); C1-C2 (40×): Adipogenic differentiation was demonstrated by Oil Red O staining and PPARγ2 expression(C3), C1 is taken as control (without inducement)

本实验获得的 hMSCs 表达全能性细胞的标志 Oct-4, 说明建立的 hMSCs 细胞系具多潜能细胞的特征。hMSCs 还表达 CK19(上皮细胞的标记基因) 和 c-met(肝细胞生长因子受体)。肝损伤后, 肝组织分泌大量的生长因子, 其中肝细胞生长因子对细胞增殖迁移、组织损伤和修复有作用, hMSCs 细胞

表达 c-met 提示该细胞有可能用于肝损伤后的修复。hMSCs 表达基质来源因子 1α (α-chemokine stromal derived factor, SDF-1α), SDF-1α 不仅在 HPSC(hematopoietic stem/progenitor cells) 归巢过程中起关键作用^[14], 而且通过 CXCR4-SDF-1 途径, 化学吸附骨髓中表达 CXCR4 的早期肌肉、肝、神经

细胞^[15,16],通过引导组织特异性祖细胞的归巢,在组织损伤后修复过程中起作用。新近的实验结果显示 hMSCs 在体外可以分化为有功能的肝细胞^[13],体内参与肝脏损伤修复^[17],其中的机制还不清楚。虽然目前 hMSCs 已用于体内细胞移植的实验研究^[17,18],但对用于移植的 hMSCs 分子特征与分化潜能的鉴定很少,而且大多使用的是杂合的细胞。因此,得到克隆化纯化扩增的 hMSCs,鉴定其细胞特征和分化潜能,这对将来研究移植细胞的命运及其参与组织损伤修复机制尤其重要。

hMSCs 还表达多种细胞外基质 CD49a(α_1 -integrin)、CD29(β_1 -integrin)和受体如 CD44(透明质酸盐受体)、c-met(肝细胞生长因子受体)。提示其在营造骨髓微环境中通过细胞间通讯而起重要作用。不表达 II 类组织相容性抗原(HLA-DR),免疫原性低。

本实验结果显示,可以用直接法分离得到多潜能的 hMSCs,其除了具有向中胚层 3 种细胞分化的潜能,还表达上皮细胞的分子标志 CK19、CK18(数据未显示)。本实验用直接法、低密度传代可以维持 hMSCs 的未分化状态并可大量扩增间充质干细胞,该方法简便易行,获得的细胞将来有可能作为组织工程、基因治疗的种子细胞。

[参考文献]

- [1] Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells[J]. *PNAS*, 2001, 98(14):7841-7845.
- [2] Pochampally RR, Smith JR, Ylostalo J, et al. Serum deprivation of human marrow stromal cells (hMSCs) selects for a subpopulation of early progenitor cells with enhanced expression of Oct-4 and other embryonic genes[J]. *Blood*, 2004, 103(5):1647-1652.
- [3] Wynn RF, Hart CA, Corradi-Perini C, et al. A small proportion of mesenchymal stem cells strongly express functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow[J]. *Blood*, 2004, 104(9):2643-2645.
- [4] Sekiya I, Larson BL, Smith JR, et al. Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality [J]. *Stem Cells*, 2002, 20(6):530-541.
- [5] Reyes M, Lund T, Lenvik T, et al. Purification and *ex vivo* expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells[J]. *Blood*, 2001, 98(9):2615-2625.
- [6] Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells[J]. *Cell Tissue Kinet*, 1970, 3(4):393-403.
- [7] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. *Science*, 1999, 284(5411):143-147.
- [8] Hung SC, Chen NJ, Hsieh SL, et al. Isolation and characterization of size-sieved stem cells from human bone marrow[J]. *Stem Cells*, 2002, 20(6):249-258.
- [9] Jones EA, Kinsey SE, English A, et al. Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells[J]. *Arthritis Rheum*, 2002, 46(12):3349-3360.
- [10] Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells[J]. *J Cell Physiol*, 1999, 181(1):67-73.
- [11] Ferrari G, Cusella-De-Angelis G, Coletta M, et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors[J]. *Science*, 1998, 279(5356):1528-1530.
- [12] Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, et al. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons[J]. *J Neurosci Res*, 2000, 61(4):364-370.
- [13] Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, et al. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells[J]. *J Clin Invest*, 2002, 109(10):1291-1302.
- [14] Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, et al. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development[J]. *Nature*, 1998, 393(6685):595-599.
- [15] Hatch HM, Zheng D, Jorgensen ML, et al. SDF-1 α /CXCR4: a mechanism for hepatic oval cell activation and bone marrow stem cell recruitment to the injured liver of rats[J]. *Cloning Stem Cells*, 2002, 4(4):339-351.
- [16] Pituch-Noworolska A, Majka M, Janowska-Wieczorek A, et al. Circulating CXCR4-positive stem/progenitor cells compete for SDF-1-positive niches in bone marrow, muscle and neural tissues: an alternative hypothesis to stem cell plasticity[J]. *Folia Histochem Cytobiol*, 2003, 41(1):13-21.
- [17] Kim DH, Je CM, Sin JY, et al. Effect of partial hepatectomy on *in vivo* engraftment after intravenous administration of human adipose tissue stromal cells in mouse[J]. *Microsurgery*, 2003, 23(5):424-431.
- [18] Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ, et al. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats-similarities to astrocyte grafts[J]. *PNAS*, 1998, 95(7):3908-3913.

[收稿日期] 2004-10-27

[修回日期] 2004-12-13

[本文编辑] 邓晓群