文章编号:1000-5404(2010)09-0895-05

论著

人脐血源基质细胞联合造血细胞共移植促进造血重建与植入的研究

刘 颖,陈幸华,张 曦,高 蕾,张 诚,郝 磊,冯一梅 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院血液科)

[摘要] 目的 探讨人脐血源基质细胞(human umbilical cord blood-derived stromal cells, hUCBDSCs)联合脐血单个核细胞(human umbilical cord blood-mononuclear cells, hUCB-MNCs)共移植促进放射损伤BALB/c小鼠造血重建与植入的效应。**方法** BALB/c近交系小鼠经^{60}Coγ射线8.5 Gy辐照后1 d按照完全随机设计分为4组,经尾静脉分别输注生理盐水、hUCB-MNCs(1×10^7/只)、hUCB-MNCs(1×10^7/只)联合hUCBDSCs(1×10^6/只)及hUCB-MNCs(1×10^7/只)联合人骨髓基质细胞(hBMSCs,1×10^6/只)。检测移植后各组小鼠存活率、外周血象、骨髓病理变化、成纤维细胞集落形成单位(CFU-F)和脾集落形成单位(CFU-S)计数及人源CD45$^+$细胞植入率、归巢示踪等指标。**结果** 采用hUCBDSCs或hBMSCs联合移植造血受抑轻,恢复快,存活率较单移植组(45%)显著提高($P<0.05$),分别为75%和70%。尤其以hUCBDSCs共移植组促血小板恢复作用显著加强,并于移植后第21天恢复至照射前水平。hUCBDSCs共移植组在移植后14 d CFU-F(70.40±4.34/孔)、移植后21 d CFU-F(94.20±8.44/孔)和移植后12 d CFU-S计数(34.75±4.50/只)、CD45$^+$细胞植入率(34.19±2.60)%也显著高于其余组($P<0.05$)。CM-DiI标记的hUCB-MNCs在体内主要归巢至骨髓和脾脏,并以hUCBDSCs共移植组小鼠骨髓中的含量(85.20±7.89)最多($P<0.05$)。**结论** hUCBDSCs联合hUCB-MNCs共移植能加速小鼠造血重建,提高植入率。

[关键词] 人脐血;基质细胞;造血重建;植入;BALB/c小鼠
[中图法分类号] R329.2; R457.7; R55 **[文献标志码]** A

Cotransplantation of human umbilical cord blood-derived stromal cells and human umbilical cord blood-mononuclear cells accelerates hematopoietic reconstruction and engraftment in radiation-injured mice

Liu Ying, Chen Xinghua, Zhang Xi, Gao Lei, Zhang Cheng, Hao Lei, Feng Yimei (Department of Hematology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[Abstract] Objective To study the effect of co-transplantation of human umbilical cord blood-derived stromal cells (hUCBDSC) and human umbilical cord blood-mononuclear cells (hUCB-MNC) on hematopoietic reconstruction and engraftment in BALB/c mice with radiation damage. **Methods** One day after irradiation with ^{60}Coγ at 8.5 Gy, the animals were randomly divided into 4 groups, which were infused with saline, hUCB-MNC(1×10^7 per mouse), hUCB-MNC(1×10^7 per mouse) and hUCBDSC(1×10^6 per mouse), and hUCB-MNC (1×10^7 per mouse) and hBMSC (1×10^6 per mouse) respectively, through their tail vein. Survival rate, peripheral hemogram, marrow pathological change, CFU-F, CFU-S, engraftment rate, and homing tracing in each group were detected, respectively. **Results** The survival rate of mice was 75% and 70%, respectively, after co-transplantation of hUCB-MNC and hUCBDSC or hBMSC ($P<0.05$), which was significantly higher than the only hUCB-MNCs group. The number of platelets was increased in the hUCBDSC plus hUCB-MNC group and became normal 21 d after operation. CFU-F_{14} (70.40±4.34 /well), CFU-F_{21} (94.20±8.44 /well), CFU-S_{12} (34.75±4.50 per mouse) and the engraftment rate (34.19±2.60)% were significantly higher in the hUCBDSC co-transplantation group than in other groups ($P<0.05$). hUCB-MNC labeled by CM-DiI were mainly distributed in bone marrow and spleen, especially in hUCBDSC plus hUCB-MNC group (85.20±7.89) ($P<0.05$). **Conclusion** Co-transplantation of hUCBDSC and hUCB-MNCs can significantly promote hematopoietic reconstruction and elevate the engraftment rate.

[Key words] human umbilical cord; stromal cells; hematopoietic reconstruction; engraftment; BALB/c mice

Supported by the National Natural Science Foundation of China(30971109), the Natural Science Foundation of Chongqing(CSTC2009BA5011), the Chongqing Key Medical Discipline Construction Foundation (2006C028) and the "1520 Project for Personnel Training" of Xinqiao Hospital in Third Military Medical University. Corresponding author: Chen Xinghua, E-mail: xhchen888@yahoo.com.cn

[基金项目] 国家自然科学基金(30971109);重庆市自然科学基金(CSTC2009BA5011);重庆市医学重点学科建设基金(2006C028);第三军医大学新桥医院"1520人才培养工程"基金

[通信作者] 陈幸华,E-mail:xhchen888@yahoo.com.cn

作为造血微环境的主要成分,基质细胞对于促进造血干/祖细胞的归巢、定位、增殖、分化和成熟起重要作用。化疗后回输体外培养扩增的人骨髓基质细胞(human bone marrow stromal cells,hBMSCs)是近年来发展起来的修复造血微环境损伤的有效方法[1-4]。但由于hBMSCs来源受限、数量及增殖分化潜能随年龄增加而下降、采集骨髓增加供者痛苦和风险及涉及伦理等方面的原因限制了其在临床上的广泛应用[5,6]。前期研究中我们证实,脐血中也存在基质细胞,并通过特定的细胞因子组合使人脐血源基质细胞(human umbilical cord blood-derived stromal cells,hUCBDSCs)得以有效扩增。进一步发现hUCBDSCs能支持造血干/祖细胞扩增,特别在促进巨核系集落形成方面具有重要作用[7-9]。本研究以BALB/c小鼠辐照模型为研究对象,比较hUCBDSCs或hBMSCs分别在联合脐血单个核细胞(human umbilical cord blood-mononuclear cells, hUCB-MNCs)共移植中对造血重建及植入的影响,为hUCBDSCs的临床应用提供理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及标本来源

BALB/c近交系雄性小鼠205只,10~12周,体质量为18~24 g,购自第三军医大学实验动物中心。人脐血取自本院妇产科健康孕妇足月顺产或剖宫产婴儿脐带,采集量60~110 ml,共采集15份,肝素抗凝。骨髓取自本院血液科门诊骨髓检查无异常患者,每人采集2~4 ml,共采集5份,肝素抗凝。所有标本采集均获患者本人及家属同意。

1.2 细胞分离和培养

hUCB-MNCs的分离、hUCBDSCs和hBMSCs的培养按照本室常规方法[7,10]进行。2种基质细胞传至第2代经10 Gy的^{60}Coγ射线一次性照射消除内源性造血集落,0.25%胰酶消化后计数、备用。

1.3 实验分组设计

移植前1 d所有小鼠接受^{60}Coγ射线8.5 Gy全身辐照(剂量率40 cGy/min,距离105 cm),在3个独立的实验中,分别将80、80、45只小鼠按照完全随机设计分为:①hUCBDSCs共移植组,经尾静脉分别输入hUCBDSCs(1×10^6/只)和hUCB-MNCs(1×10^7/只);②hBMSCs共移植组,经尾静脉分别输入hBMSCs(1×10^6/只)和hUCB-MNCs(1×10^7/只);③单移植组,经尾静脉输入hUCB-MNCs(1×10^7/只);④单纯辐照组,尾静脉输入0.2 ml生理盐水。

1.4 动态观察小鼠一般状况及血象、骨髓组织恢复情况

每日观察各组小鼠($n=20$)外表、活动力、饮食、排粪等情况并测量体质量,记录各组存活率。于移植后第1、3、7、10、14、21、28天各组分别取5只小鼠断尾后取外周血,测定白细胞、血红蛋白和血小板水平。第7、14、21天各组分别脱颈处死小鼠3只,中性甲醛固定股骨48 h,行石蜡包埋切片,HE染色观察骨髓组织病理学改变。

1.5 成纤维细胞集落形成单位(colony-forming unit-fibroblast ,CFU-F)和脾集落形成单位(colony forming unit in spleen ,CFU-S)检测

各组小鼠($n=20$)分别于移植后7、14、21 d无菌取双侧股骨和胫骨,冲出骨髓制备单细胞悬液,调整细胞数为1×10^5/ml,接种至6孔板中,以DMEM/F12培养基(含10%胎牛血清,10%马血清,10^{-6} mol/L氢化可的松)常规培养。48 h后弃上清,之后半量换液,第10天分别计数CFU-F(>40个细胞/集落);于移植后第12天分别取小鼠脾脏,BOUIS液固定24 h,80%酒精脱色后5倍放大镜做脾表面结节计数。

1.6 流式细胞仪检测小鼠骨髓人源CD45$^+$细胞植入率

于移植后第6周冲出小鼠胫骨、股骨骨髓制备单细胞悬液,鼠抗人FITC标记的CD45单克隆抗体(购自美国Santa Cruz公司)与细胞悬液避光孵育,裂解红细胞,PBS洗涤后上FACS检测。

1.7 荧光法体内示踪hUCB-MNCs

按1×10^7 hUCB-MNCs加入1 μl的CM-DiI荧光染料(购自美国Molecular probe公司),分别置37 ℃和4 ℃避光放置5 min和15 min,PBS洗涤2次后分别联合hUCBDSCs(1×10^6/只)或hBMSCs(1×10^6/只)共输注给辐照后小鼠($n=15$,辐照条件同1.3),对照组($n=15$)仅输注hUCB-MNCs(1×10^7/只)。分别于第1、2、4、7、14、28天处死各组小鼠,取心、肝、肾、脾、肺、脑、小肠、皮肤等器官行冰冻切片,骨髓和外周血行常规涂片,置荧光显微镜下观察。移植后第2天制备骨髓涂片,荧光镜下随机选取5个视野,IPP 6.0软件计数荧光细胞数。

1.8 统计学处理

计量资料以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 13.0统计软件进行单因素方差分析,组间两两比较通过Tukey-Kramer法分析。对存活率的比较进行χ^2检验。

2 结果

2.1 一般状况观察

各组小鼠照射后24 h出现被毛凌乱、弓背发抖、少动拒食,以后体质量逐渐下降,至21 d时单纯辐照组小鼠全部死亡。移植各组小鼠在移植后7~10 d活动增加,反应灵敏,进食及饮水量逐渐增加,体质量开始恢复。至第28天,hUCBDSCs共移植组和hBMSCs共移植组小鼠分别死亡5只和6只,存活率分别为75%(15/20)和70%(14/20),2组差异无统计学意义($P>0.05$)。单移植组至第28天存活9只,存活率为45%(9/20),显著低于共移植组($P<0.05$)。

2.2 外周血血象检测

各组小鼠血象在照射后急剧下降,第7~10天进入三系极度抑制期。共移植组血象均在移植后28 d内恢复至放射前水平;单移植组部分回升,但明显低于共移植组($P<0.05$);单纯辐照组则一直维持在较低水平。其中,hUCBDSCs共移植组血小板受抑程度较hBMSCs共移植组轻,回升也较快,第7天血小板计数已明显高于hBMSCs共移植组($P<0.05$),并于移植后第21天恢复至照射前水平;hBMSCs共移植组白细胞于移植后10 d迅速回升,在此后高于hUCBDSCs共移植组,至21 d恢复正常;2个共移植组血红蛋白变化趋势差异无统计学意义($P>0.05$)。见表1。

表 1 各组小鼠移植后不同时相点外周血象的比较($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	WBC($\times 10^9$/L)	HGB(g/L)	PLT($\times 10^9$/L)
单纯辐照组			
1 d	5.65 ± 0.96	109.23 ± 8.42	499.81 ± 47.06
3 d	1.13 ± 0.28	67.44 ± 6.36	167.42 ± 29.23
7 d	0.37 ± 0.15	51.51 ± 8.93	46.24 ± 12.55
10 d	0.60 ± 0.14	45.35 ± 5.63	77.83 ± 19.42
14 d	0.88 ± 0.24	54.27 ± 8.16	87.27 ± 12.52
21 d	–	–	–
28 d	–	–	–
单移植组			
1 d	5.40 ± 0.72	123.33 ± 13.53	524.84 ± 39.31
3 d	1.84 ± 0.18	93.36 ± 8.67^a	234.65 ± 26.50^a
7 d	0.96 ± 0.24^a	62.61 ± 3.41	96.23 ± 21.95^a
10 d	1.39 ± 0.09^a	65.35 ± 3.28	113.23 ± 28.73^a
14 d	2.42 ± 0.16^a	64.45 ± 4.59	206.84 ± 37.56^a
21 d	3.92 ± 0.23	93.38 ± 8.93	274.35 ± 26.18
28 d	4.90 ± 0.16	114.42 ± 10.96	356.41 ± 27.77
hBMSCs 共移植组			
1 d	6.14 ± 0.95	146.37 ± 13.54	510.44 ± 27.59
3 d	2.30 ± 0.29^a	107.57 ± 9.87^a	275.83 ± 37.75^a
7 d	1.58 ± 0.15^{ab}	87.78 ± 8.56^a	136.48 ± 19.37^{ab}
10 d	2.65 ± 0.14^{ab}	78.34 ± 6.76^a	188.89 ± 26.34^{ab}
14 d	3.70 ± 0.23^{ab}	92.45 ± 8.32^{ab}	279.22 ± 27.59^{ab}
21 d	5.89 ± 0.35^b	143.35 ± 14.38^b	381.22 ± 20.65^b
28 d	6.62 ± 0.37^b	176.91 ± 18.45^b	497.24 ± 34.24^b
hUCBDSCs 共移植组			
1 d	6.71 ± 0.18	138.32 ± 11.20	534.48 ± 57.70
3 d	2.18 ± 0.28^a	104.87 ± 9.50^a	298.35 ± 26.30^{ab}
7 d	1.74 ± 0.23^{ab}	78.54 ± 3.50^a	207.56 ± 43.85^{abc}
10 d	2.30 ± 0.38^{ab}	82.23 ± 5.10^a	254.61 ± 25.38^{abc}
14 d	3.15 ± 0.25^{ab}	105.12 ± 8.70^{ab}	353.42 ± 28.55^{abc}
21 d	4.77 ± 0.30^{bc}	132.35 ± 8.97^b	431.24 ± 59.37^b
28 d	6.18 ± 0.18^b	188.91 ± 4.30^b	535.82 ± 35.12^b

a:$P<0.05$,与单纯辐照组比较;b:$P<0.05$,与单移植组比较;c:$P<0.05$,与 hBMSCs 共移植组比较

2.3 骨髓组织切片病理学观察

移植后第 7 天,单纯辐照组出现严重造血衰竭,造血组织急剧减少,骨小梁断裂,纤维组织增生(图 1A),之后一直处于不可逆的严重抑制状态;共移植组造血抑制程度较单移植组轻,仍可见部分残存骨髓,髓窦充血淤血,脂肪细胞充塞(图 1B)。第 14 天,除单纯辐照组外各组均有不同程度造血恢复,骨髓有核细胞增生活跃、比例增加,共移植组恢复程度明显好于单移植组(图 1C、D),骨小梁周围可见梭形基质细胞平行排列,以 hUCBDSCs 共移植组最为明显(图 1E)。至第 21 天,单移植组和 hBMSCs 共移植组尚不能完全恢复正常(图 1F、G),有效造血面积明显低于 hUCBDSCs 共移植组;hUCBDSCs 共移植组骨髓增生明显活跃,有核细胞呈簇状密布于骨髓腔内,形成多个新生造血灶,巨核细胞大量可见(图 1H)。

2.4 成纤维细胞集落形成单位检测

移植后小鼠骨髓 CFU-F 均明显下降,第 7 天单纯辐照组数量最低,单移植组 CFU-F 数量显著低于共移植组($P<0.05$),hUCBDSCs 共移植组与 hBMSCs 共移植组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。第 14 天和 21 天,单纯辐照组数量增加不明显,单移植组数量仍显著低于 2 个共移植组($P<0.05$)。其中,hUCBDSCs 共移植组 CFU-F 数量明显多于 hBMSCs 共移植组($P<0.05$,表 2)。

表 2 各组小鼠移植后不同时间骨髓 CFU-F 计数的比较

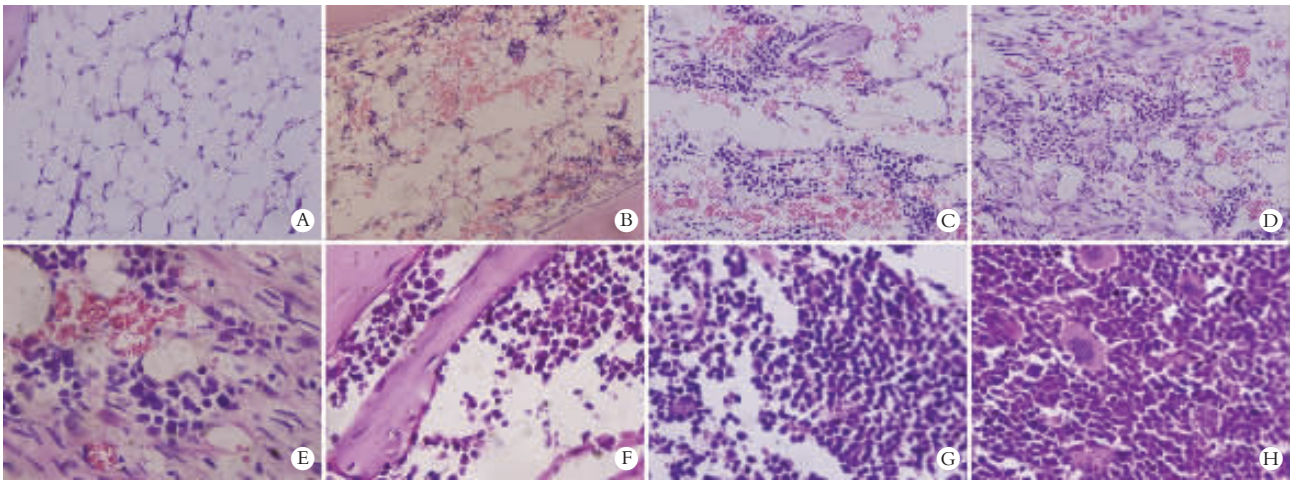
(个/孔,$n=3$, $\bar{x} \pm s$)

组别	第 7 天	第 14 天	第 21 天
单纯辐照组	9.40 ± 1.14	18.40 ± 2.88	–
单移植组	18.20 ± 4.15^a	35.60 ± 5.41^a	53.40 ± 7.96
hBMSCs 共移植组	29.20 ± 3.27^{ab}	54.40 ± 6.69^{ab}	77.40 ± 9.18^b
hUCBDSCs 共移植组	31.80 ± 4.66^{ab}	70.40 ± 4.34^{abc}	94.20 ± 8.44^{bc}

a:$P<0.05$,与单纯辐照组比较;b:$P<0.05$,与单移植组比较;c:$P<0.05$,与 hBMSCs 共移植组比较

2.5 脾集落形成单位测定

移植后第 12 天放大镜下计数脾造血集落结节,单纯辐照组小鼠 CFU-S 数量最少(5.25 ± 1.26/只),单移植组(12.50 ± 2.08/只)显著少于 hBMSCs 共移植组(26.25 ± 3.59/只)和 hUCBDSCs 共移植组(34.75 ± 4.50/只)($P<0.05$)。



A:单纯辐照组移植后第 7 天(×400);B:hUCBDSCs 共移植组移植后第 7 天(×400);C:hBMSCs 共移植组移植后第 14 天(×400);D:hUCBDSCs 共移植组移植后第 14 天(×400);E:hUCBDSCs 共移植组移植后第 14 天(×1 000);F:单移植组移植后第 21 天(×1 000);G:hBMSCs 共移植组移植后第 21 天(×1 000);H:hUCBDSCs 共移植组移植后第 21 天(×1 000)

图 1 各组小鼠移植后不同时间骨髓组织病理学观察 (HE)

2.6 小鼠体内人特异性 $CD45^+$ 细胞检测

移植后第6周 hUCBDSCs 共移植组 $CD45^+$ 细胞百分率(34.19±2.60)%显著高于 hBMSCs 共移植组(24.16±3.19)%($P<0.05$);且2组均明显高于单移植组(10.95±2.40)%($P<0.05$)。结果表明,2种基质细胞联合造血细胞共移植均能有效促进造血细胞在骨髓中的植入,提高移植成功率。

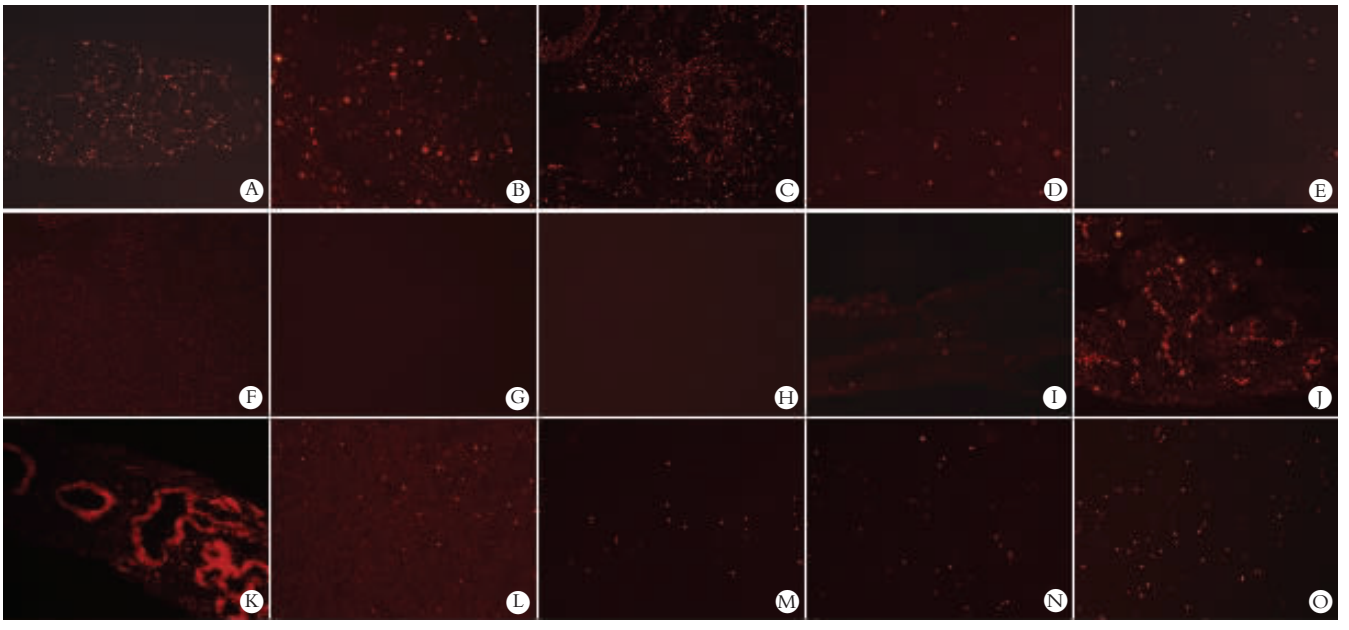
2.7 CM-DiI 标记 hUCB-MNCs 在体内的示踪观察

CM-DiI 标记的 hUCB-MNCs 在倒置荧光显微镜下发红色荧光(图2)。镜下可见移植后第1天,主要分布在骨髓、外周血以及脾、肝、肺等血供丰富的组织,其他脏器未见明显红色荧光;至第2天,骨髓和脾脏中荧光细胞最多,肺、肝脏及小肠仅有少量荧光细胞可见;至第4天,荧光细胞则主要分布于骨髓和脾脏,其余组织器官几乎不可见;至第28天,荧光细胞仍可在骨髓中检测到。移植后第2天,hUCBDSCs 共移植组小鼠骨髓中荧光标记的 hUCB-MNCs(85.20±7.89)含量明显多于 hBMSCs 共移植组(68.20±7.98)和单移植组(31.20±4.55)($P<0.05$)。

3 讨论

基质细胞由间充质干细胞分化而来,是一个包括成纤维细胞、内皮细胞、成骨细胞等复杂的异质细胞群,可能通过形成造血干细胞生长的龛(niche)生成造血生长因子,分泌细胞外基质等发挥造血调节作用[11]。作为一种新型造血基质细胞,hUCBDSCs 具有来源丰富、取材方便、较低免疫原性等特点,在多种造血系统疾病临床治疗中具有潜在的应用价值[9,12]。我们结合临床工作实际情况采用 hUCB-MNC 这种包含多种细胞成分的有核细胞作为造血细胞分别与2种不同来源基质细胞(hBMSCs 或 hUCBDSCs)联合移植对比观察对辐照损伤小鼠造血重建的影响。结果表明,联合移植能明显降低小鼠死亡率,外周血象受抑及骨髓组织受损程度减轻,恢复较快,尤以 hUCBDSCs 促巨核系细胞恢复的作用显著,这与我们在前期体外研究中发现 hUCBDSCs 分泌 TPO 水平明显高于 hBMSCs 的结果一致[7,13]。结果提示,hUCBDSCs 可能有助于临床移植后受体血小板的恢复,减少血小板的输注及出血导致的死亡。

CFU-F 是反映骨髓中基质细胞数量及增殖能力的重要指标,放/化疗预处理可损伤骨髓造血微环境,导致 CFU-F 数量显著降低[14]。Galotto 等[15]研究发现,造血干细胞移植后1~12年患者骨髓 CFU-F 的形成能力较正常对照下降60%~90%,部分患者于移植后12年尚未恢复。CFU-S 是由造血干细胞增殖分化在脾形成的细胞团,是检测造血干/祖细胞在脾脏定居存活及增殖能力的经典指标[16]。移植后12 d从小鼠脾脏中检出的 CFU-S 是一种兼顾了较早期造血干细胞和较晚期干/祖细胞的由多系造血细胞组成的混合集落[17]。本研究发现,联合移植组 CFU-F 和 CFU-S 数量显著高于单移植组,且以 hUCBDSCs 共移植组最多,揭示基质细胞特别是hUCBDSCs可能在参与修复和



A~I:分别为 hUCBDSCs 共移植组移植后第1天小鼠脾、肝、肺、骨髓、外周血、心、肾、脑和皮肤;J、K:分别为 hUCBDSCs 共移植组移植后第2天和第4天小鼠脾;L:hUCBDSCs 共移植组移植后第4天小鼠骨髓;M~O:分别为移植后第2天单移植组、hBMSCs 共移植组和 hUCBDSCs 共移植组小鼠骨髓

图2 各组小鼠移植后不同时间 CM-DiI 标记的 hUCB-MNCs 在各组织的归巢分布观察 (荧光显微镜 ×400)

组成新造血微环境的同时,还与造血干细胞起协同作用,促进造血干细胞增殖和分化,加快体内造血功能重建。

移植后造血细胞稳定植入的前提是其在移植初期能正确归巢和定位于骨髓[18]。$CD45^+$细胞为人源性造血细胞特有标记,可区别于鼠源性细胞作为检测造血植入的重要指标[19]。我们在移植后6周流式细胞仪计数$CD45^+$细胞百分比,hUCBDSCs共移植组小鼠骨髓中人$CD45^+$细胞阳性率明显高于其余各组,提示hUCBDSCs在移植后造血植入方面具有促进作用,为进一步持续稳定造血提供了物质基础。为印证这一结果,我们采用CM-DiI标记hUCB-MNC,观察其在小鼠体内各组织的归巢分布情况。CM-DiI是一种亲脂碳花青染料,因着色能力强,对活体细胞无毒性、在体内不易复染其他组织,近年来被广泛应用于体内示踪研究[20]。结果显示,hUCB-MNC在移植初期主要归巢于骨髓、脾脏等造血器官,且移植后第2天hUCBDSCs共移植组小鼠骨髓中单个核细胞数量最多,这与Hubin等[21]和Jin-Xiang等[18]研究结果一致。提示hUCBDSCs在引导造血干/祖细胞在小鼠体内向骨髓富集(归巢)和植入的同时,也促进了造血干/祖细胞在体内的增殖。

综上,本实验结果证实hUCBDSCs联合造血细胞共移植能促进造血重建及植入,提高移植成功率,具有重要的临床应用前景。

参考文献:

[1] Bilko N M, Votyakova I A, Vasylovska S V, *et al*. Characterization of the interactions between stromal and haematopoietic progenitor cells in expansion cell culture models[J]. Cell Biol Int, 2005, 29(1): 83-86.

[2] Januszewski M, Dabrowski Z, Adamus M, *et al*. Three-dimensional model of bone marrow stromal cell culture[J]. Biomed Mater Eng, 2003, 13(1): 1-9.

[3] Xu Z S, Liu Y J, Lv L L, *et al*. Bone marrow stromal cells transduced with human hemangiopoietin gene support hematopoiesis *in vitro*[J]. Haematologica, 2005, 90(2): 157-165.

[4] Almeida-Porada G, Porada C D, Tran N, *et al*. Cotransplantation of human stromal cell progenitors into preimmune fetal sheep results in early appearance of human donor cells in circulation and boosts cell levels in bone marrow at later time points after transplantation[J]. Blood, 2000, 95(11): 3620-3627.

[5] Nishida S, Endo N, Yamagiwa H, *et al*. Number of osteoprogenitor cells in human bone marrow markedly decreases after skeletal maturation[J]. J Bone Miner Metab, 1999, 17(3): 171-177.

[6] Stenderup K, Justesen J, Clausen C, *et al*. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells[J]. Bone, 2003, 33(6): 919-926.

[7] Gao L, Chen X, Zhang X, *et al*. Human umbilical cord blood-derived stromal cell, a new resource of feeder layer to expand human umbilical cord blood $CD34^+$ cells *in vitro*[J]. Blood Cells Mol Dis, 2006, 36(2): 322-328.

[8] 张诚,陈幸华,高蕾,等. 人脐血源基质细胞分离培养条件的优化[J]. 解放军医学杂志, 2008, 33(3): 243-252.

[9] 高蕾, 陈幸华, 张曦, 等. 促血小板生成素途径在人脐血源基质细胞促进巨核细胞增殖中的作用[J]. 解放军医学杂志, 2008, 33(6): 669-672.

[10] 梁雪, 陈幸华, 张曦, 等. 不同来源骨髓基质细胞微环境对Jurkat细胞生物学特性的影响[J]. 第三军医大学学报,2008, 30(23): 2229-2232.

[11] Quarto R, Bianchi G, Derubeis A, *et al*. Bone marrow stromal cells: cell biology & clinical applications[J]. Eur Cells Mater, 2002, 4(Suppl 1): 28.

[12] Hao L, Zhang C, Chen X H, *et al*. Human umbilical cord blood-derived stromal cells suppress xenogeneic immune cell response *in vitro*[J]. Croat Med J, 2009, 50(4): 351-360.

[13] 刘耀, 陈幸华, 张曦, 等. 人脐血基质细胞自发分泌多种造血生长因子的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(7): 643-645.

[14] Shi M, Adachi Y, Shigematsu A, *et al*. Intra-bone marrow injection of donor bone marrow cells suspended in collagen gel retains injected cells in bone marrow, resulting in rapid hemopoietic recovery in mice[J]. Stem Cells, 2008, 26(9): 2211-2216.

[15] Galotto M, Berisso G, Delfino L, *et al*. Stromal damage as consequence of high-dose chemo/radiotherapy in bone marrow transplant recipients[J]. Exp Hematol, 1999, 27(9): 1460-1466.

[16] Zhang Y, Adachi Y, Suzuki Y, *et al*. Simultaneous injection of bone marrow cells and stromal cells into bone marrow accelerates hematopoiesis *in vivo*[J]. Stem Cells, 2004, 22(7): 1256-1262.

[17] Zhang Y, Adachi Y, Suzuki Y, *et al*. Synergistic effects of granulocyte-colony stimulating factor and macrophage-colony stimulating factor on recovery of donor hematopoietic cells in allogeneic bone marrow transplantation[J]. Oncol Rep, 2006, 16(2): 367-371.

[18] Jin-Xiang F, Xiaofeng S, Jun-Chuan Q, *et al*. Homing efficiency and hematopoietic reconstitution of bone marrow-derived stroma cells expanded by recombinant human macrophage-colony stimulating factor *in vitro*[J]. Exp Hematol, 2004, 32(12): 1204-1211.

[19] Brenner M K, Wulf G G, Rill D R, *et al*. Complement-fixing CD45 monoclonal antibodies to facilitate stem cell transplantation in mouse and man[J]. Ann NY Acad Sci, 2003, 996: 80-88.

[20] Ruhparwar A, Bara C, Kofidis T, *et al*. *In vivo* detection of integration of grafted cells after myocardial transplantation[J]. Zentralbl Chir, 2006, 131(5): 420-424.

[21] Hubin F, Humblet C, Belaid Z, *et al*. Murine bone marrow stromal cells sustain *in vivo* the survival of hematopoietic stem cells and the granulopoietic differentiation of more mature progenitors[J]. Stem Cells, 2005, 23(10): 1626-1633.

(收稿:2009-11-03;修回:2009-12-04)

(编辑 邓强庭)