文章编号:1000-5404(2010)20-2163-05

论著

大鼠骨髓间充质干细胞体外培养条件的优化及生物学特性

赵玉金[1],李瑶琛[2],赖洁娟[3],王海燕[1],黄苏娜[1],蒋建新[1] (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所第四研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室[1];400038 重庆,第三军医大学西南医院:全军眼科中心[2],全军肝胆外科研究所[3])

【摘要】 **目的** 建立一种新的高效体外骨髓间充质干细胞纯化培养方法,并对所获得细胞进行生物学行为研究。**方法** 采用全骨髓培养获得原代骨髓间充质干细胞,经体外成脂、成骨诱导分化并检测细胞表面分子表达对所获得干细胞进行鉴定,传代后低密度接种($3\times10^3/cm^2$)结合机械擦除对所培养细胞进行纯化,并对未纯化及纯化细胞分别进行集落形成单位实验、生长曲线及细胞周期分析来研究其生物学特性。**结果** 全骨髓贴壁法可以成功培养出骨髓间充质干细胞,细胞呈现干细胞特性生长;可在体外成功地进行成脂、成骨分化;阴性表面标记分子 CD34、CD45 表达率均小于 2%,阳性表面标记 CD73、CD90 表达率均高于 95%。经纯化后的细胞具有更优的生物学行为,表现在:克隆形成率达到(28.80±5.00)%($P<0.01$);培养 12 d 后细胞数量增加(26.18±4.80)倍($P<0.05$);处于 $S+G_2/M$ 期的细胞比例达到(45.98±1.60)%($P<0.01$)。**结论** 低密度接种结合机械擦除方法可以获得高纯度骨髓间充质干细胞,且该细胞具有更佳的生物学特性。

【关键词】 骨髓间充质干细胞;细胞生物学行为;细胞培养;条件优化
【中图法分类号】 R329-33;R329.28 **【文献标志码】** A

Optimization of culturing rat bone marrow mesenchymal stem cells and their biological behaviors

Zhao Yujin[1], Li Yaochen[2], Lai Jiejuan[3], Wang Haiyan[1], Huang Suna[1], Jiang Jianxin[1] ([1]State Key Laboratory of burns, Trauma, and Combined Injury, Department 4, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042; [2]Department of Ophthalmonogy, [3]Institute of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

【Abstract】 **Objective** To establish a new and effective method of purifying rat bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) *in vitro* and to study the biological behaviors of the cultured cells. **Methods** BMSCs were cultured by whole bone marrow culture method. To identify BMSCs, the experiments of adipogenic and osteogenic differentiation were carried out and flow cytometry was employed to detect surface antigens. The cells were purified by planting in lower density ($3\times10^3/cm^2$) and by erasing the peripheral large-and-flattened cells that surrounded the "colony". The biological behaviors of these cells such as colony-forming-unit test, growth curve, and cell cycle analysis were further compared to those planted in a higher density ($3\times10^4/cm^2$). **Results** BMSCs were successfully cultured by whole bone marrow method, and they could be induced into adipocytes and osteocytes *in vitro*. Flow cytometry demonstrated that the expressions of CD34 and CD45 were lower than 2%, and those of CD73 and CD90 were more than 95%. Furthermore, the purified cells showed stronger stemness features during their growth. The efficacy of CFU test was (28.80±5.00)% ($P<0.01$). The cell amount of those cultured for 12 d was increased by 26.18±4.80 times ($P<0.05$). The percentage of the cells at $S+G_2/M$ phase was (45.98±1.60)% ($P<0.01$). **Conclusion** More purified BMSCs are obtained by culturing cells in lower density combining with erasing peripheral large-and-flattened cells, and the cells have better biological properties.

【Key words】 bone marrow mesenchymal stem cells; cell biology behavior; cell culture; condition optimization

Corresponding author: Jiang Jianxin, Tel: 86-23-68757401, E-mail: hellojjx@126.com

【通信作者】 蒋建新,电话:(023)68757401,E-mail:hellojjx@126.com

骨髓中最主要的细胞成分是造血干细胞。此外，它还含有极少量的非造血干细胞，其中包括骨髓间充质干细胞（bone marrow mesenchymal stem cells，BMSCs），它占骨髓细胞单个核细胞总数的0.000 1%～0.001%[1]。由于取材简单、易于诱导分化，BMSCs受到了许多临床疾病研究者的青睐，其有望用于某些临床疑难疾病的治疗。因此能够在短时间内获得大量优质BMSCs就显得十分重要。目前，在原代培养BMSCs的过程中主要存在的困难有：微生物及杂细胞的污染（包括单核-巨噬细胞、造血细胞等）、细胞增殖速度逐渐减缓、细胞活力变差等。尽管有研究者通过控制胰酶消化时间去除污染的杂细胞[1]，但是在细胞大量扩增过程中如何将其维持在增殖能力强的高活力状态目前仍少见报道。我们将细胞传代后采用低密度（常规接种密度的1/10）接种培养，充分利用干细胞的成克隆性生长特性，将细胞克隆周边的宽大扁平细胞进行机械性擦除，并对所获得细胞进行生物学行为研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 4周雄性SD大鼠3只，体质量约80 g，由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。

1.1.2 主要仪器和试剂 CO_2培养箱（Thermo Forma），流式细胞仪（BD Science），DMEM/F12培养基（HyClone），胎牛血清（Gibco），胰酶（HyClone），EDTA（湘中地质），谷氨酰胺（Sigma），CD34（Santa），CD45（BD），CD90（BD），IgG1同型对照（BD），CD73（BD），APC标记IgG同型对照（Biolegend），碱性磷酸酶检测试剂盒（Sigma）。

1.1.3 试剂配制 10%胎牛血清培养基（10% FBS，2 mmol/L谷氨酰胺，100 U/ml青霉素及链霉素，pH 7.2～7.4）；0.25%胰酶-0.02% EDTA；含有双抗D-Hanks（100 U/ml青霉素及链霉素）；成脂诱导培养基（10% FBS，地塞米松10^{-6} mol/L，IBMX 0.5 mmol/L，吲哚美辛60 μmol/L，胰岛素1 mg/L）；成骨诱导培养基（地塞米松10^{-7} mol/L，左旋维他命C 50 μg/ml，β-甘油磷酸钠10 mmol/L）；油红O异丙醇储存液（0.5%质量体积分数）；茜素红水溶液（1%质量体积分数）。

1.2 方法

1.2.1 BMSCs原代细胞获取及培养[2,3] 将大鼠断颈处死，全身喷洒75%（体积分数）的酒精溶液后在无菌环境下迅速取出双侧下肢，浸入含有双抗的D-Hanks液中，洗涤并去除肌肉及附着软组织，剪开长骨两端，用18G针头、DMEM/F12将骨髓冲出后使用5 ml滴管吹打，使用100目不锈钢滤网过滤后离心1次（250 × g，3 min），弃上清后用含有10%胎牛血清的DMEM/F12培养基重悬细胞，并全部接种于T75培养瓶中，放入培养箱中（37 ℃，5% CO_2）培养。24 h后，将原培养基吸弃并用D-Hanks轻柔洗涤2次后加入新鲜培养基。原代细胞至达到90%以上融合可予传代。

1.2.2 细胞传代 细胞生长达到至90%以上融合即可传代。吸弃原培养基后用D-Hanks洗涤2次，加入约3 ml 0.25%胰酶－0.02% EDTA，镜下观察，至细胞收缩变圆，加入等量10%胎牛血清DMEM/F12终止消化，按顺序吹打细胞瓶底面收集细胞悬液并离心，250 × g，3 min，将获得的全部细胞以1∶2进行传代接种（细胞密度约为$3 \times 10^4/cm^2$）。

1.2.3 BMSCs成脂成骨分化诱导及染色[4,5]

1.2.3.1 成脂诱导及染色 将培养至3代的细胞以$3 \times 10^4/cm^2$接种于6孔板，对照组及实验组各2孔。对照孔仅加入普通培养基，3 d换液1次；实验孔待细胞生长至全部融合后将原培养基吸弃，D-Hanks洗涤1次后加入足量诱导培养基，每3天换液1次，至第14天。将细胞用PBS洗涤后4%（质量体积分数）多聚甲醛室温固定10 min。将油红储存液与PBS以3∶2配制成工作液，并用0.22 μm滤器过滤，加入固定后的细胞中，室温反应20 min，再用PBS洗涤，直至背景干净，再向每孔加入约2 ml PBS，镜下观察并成像。

1.2.3.2 成骨诱导及染色 在成骨诱导实验中，对照孔处理同上。进行碱性磷酸酶染色时，将原代细胞或培养至3代的细胞以$1 \times 10^4/cm^2$接种于6孔板，实验孔待细胞生长至70%融合后将原培养基吸弃，D-Hanks洗涤1次后加入足量诱导培养基，每3天换液1次，共诱导14 d。第14天时，将细胞按上述方法固定，采用碱性磷酸酶试剂盒进行染色，操作按说明书进行。肉眼或显微镜观察并成像。茜素红染色时，细胞接种和诱导同上，但诱导时间为21 d。第21天时，将细胞固定，用0.22 μm小滤器将茜素红染液过滤，用0.1%（体积分数）氨水调节其pH为4.1～4.3，向6孔板中加入染液，室温反应20 min，洗涤，加入PBS并观察。

1.2.4 BMSCs表面标记检测 消化并计数第3代细胞，分别将每1×10^6细胞重悬于PBS缓冲液中，分别加入CD34、CD45、CD73、CD90及每个抗体的同型对照，反应在1.5 ml的EP管内进行，每个EP管的反应体积为100 μl，4 ℃避光，30 min后用3%（体积分数）胎牛血清PBS洗涤液洗涤2次，再用200 μl洗涤液重悬。置冰上，准备上机检测。检测前分别从各管取出50 μl，其余150 μl加入1个TEST 7-AAD做细胞活性检测。

1.2.5 不同密度接种后细胞培养 将第3代细胞按上述方法消化后将细胞分为2组，分别以$3 \times 10^4/cm^2$、$3 \times 10^3/cm^2$接种在T75培养瓶中进行培养。以高密度接种的细胞传代方法不变，而对于低密度接种的细胞采用下面的方法：由于接种的细胞密度较低，因此在见到“克隆”形成时，即可以进行传代。传代前，吸弃大部分培养基，用消毒好的棉签将“克隆”间宽大扁平的细胞擦掉，小心不要碰到形态良好的细胞。用D-Hanks洗涤，消化传代，接种时保持低密度不变。

1.2.6 BMSCs集落形成单位实验[6] 分2组，分别将按高密度及低密度接种培养至第5代的细胞消化并计数，以500/孔接种于6孔板中，培养10 d，其间予正常换液。至第10天时，吸弃培养基，PBS洗涤2次后，4%（质量体积分数）多聚甲醛室温固定10 min，PBS洗涤后每孔加入3 ml、1%（质量体积分数）吉姆萨染液覆盖底面，室温放置15 min，再用PBS洗涤至背景干净，计数蓝染圆点。

1.2.7 BMSCs生长曲线绘制[7] 分别利用上述2组细胞以1×10^4/孔接种于6孔板中，共接种14孔。于接种2 d后开始

计数,每次计数 2 孔,计算平均值及标准差,隔 1 天计数 1 次,直至第 14 天。以接种后天数为横坐标,细胞数为纵坐标,绘制生长曲线。

1.2.8　BMSCs 细胞周期检测　　分别将上述 2 组 5 代细胞消化并 PBS 洗涤后,70%(体积分数)乙醇固定,PI 染色,利用流式细胞仪进行细胞周期的检测。

1.2.9　统计学处理　　运用 SPSS 10.0 统计软件进行分析。实验数据为正态分布,方差具有齐同性,采用独立样本 t 检验进行比较。

2　结果

2.1　BMSCs 的原代及传代后培养

全骨髓细胞接种于培养瓶后,可见单个圆形细胞悬浮于含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养基中。24 h 后首次换液,大部分悬浮细胞被除去,光镜下可见散在分布的成簇的贴壁细胞,细胞呈现放射状紧密排列,单个细胞伸展成长梭形或多角形,突起明显,胞核较大,核仁清晰可见,胞体折光性强。随着原代培养时间延长,集落内细胞数目快速增加,放射状、漩涡状趋势更加明显,单个细胞也呈现较为均一的纺锤形。至原代接种第 6~7 天,细胞几乎全部融合。此时由于密集处细胞间空隙十分小,单个细胞轮廓不清晰,但可以明显观察到生长在较为稀疏的集落间的细胞多呈现宽大扁平形,且形态不规则(图 1A、B)。按常规的 1:2传代接种(接种密度为较高的 $3\times10^4/cm^2$)。传代后第 1 天,约 50% 融合,细胞呈长梭形、多角形,均匀散在分布,其间明显可见宽大扁平细胞,且此种细胞比例约占 50%,细胞立体感减弱(图 1C)。

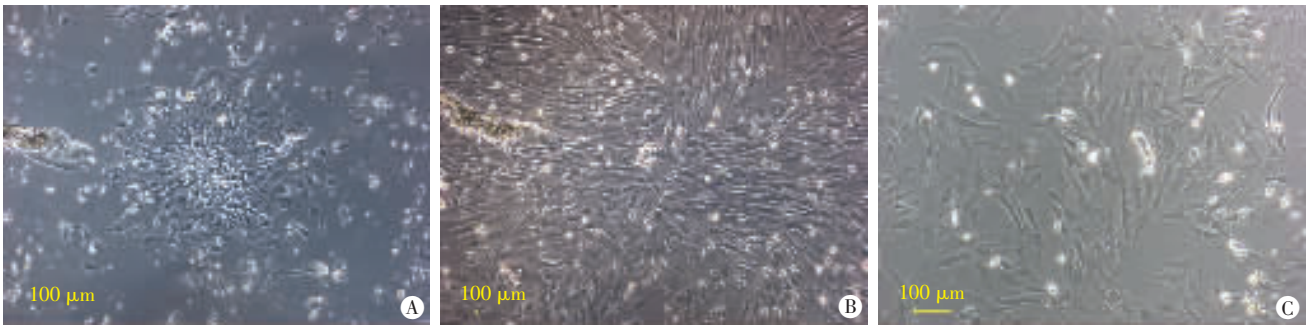
2.2　BMSCs 成脂成骨诱导分化

2.2.1　成脂分化　　P3 细胞成脂诱导至第 14 天,对照孔细胞仍呈现长梭形、扁平样;实验组细胞密度减低,细胞间空隙增大,可见圆形高亮细胞,有些椭圆形细胞内可见呈串珠样排列分布的脂样小滴。染色后,对照组未见着色,而实验组出现较多强阳性成脂细胞,其特征为细胞体积较大、圆形、内含鲜红色串珠样或大的融合脂滴(图 2A)。

2.2.2　成骨分化　　P3 细胞成骨诱导至第 14 天,对照孔内细胞密集排列,呈长梭形;实验孔内有些区域细胞轮廓不清,呈现细碎颗粒样、扁平样。碱性磷酸酶染色后,对照孔内未见明确着色区域;实验孔内出现片状不规则蓝紫色区域。P0 细胞成骨诱导至第 21 天,对照孔内细胞形态同 P3 细胞 14 d 的对照组,实验孔内细胞普遍呈现方形、五角形,轮廓不清,细胞透光性差。茜素红染色后,对照孔内呈现苍白色,未见着色区域;实验孔呈现广泛的橙红色,在此背景下可见圆形、椭圆形红黑色团块,且经洗涤后不能去除(图 2B、C)。

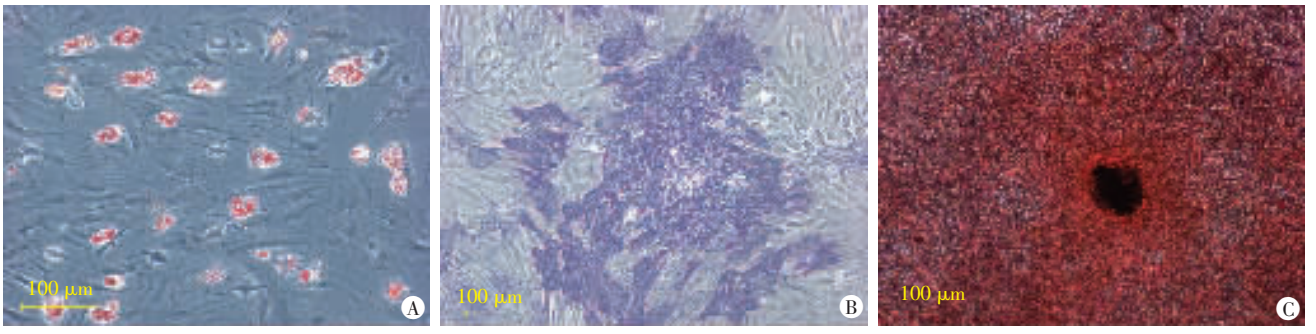
2.3　BMSCs 表面标记检测

检测结果显示:所选 4 个表面标记中,造血系干细胞表面阳性分子表达率为:CD34 0.3%、CD45 0.4%;间质干细胞表面阳性分子标记表达率为:CD73 95.4%、CD90 100%。



A:原代细胞(P0,第 1 天)首次换液后形成的细胞"集落"　细胞呈现放射样分布,单个细胞呈现长梭形;B:同一视野下 P0 第 6 天　细胞形成明显的漩涡、放射趋势,单个细胞呈现长梭形;C:P2 细胞生长 1 d 后　细胞散在分布,具有呈漩涡样趋势,单个细胞大多呈现长梭形,开始出现宽大扁平细胞

图 1　倒置显微镜下 BMSCs 的原代及传代后培养观察

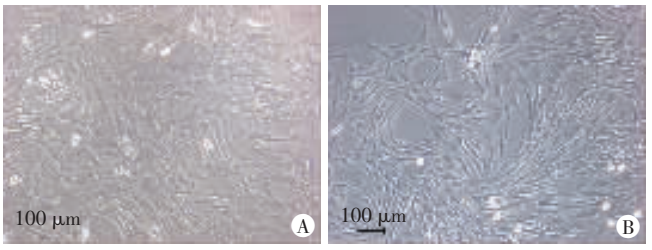


A:BMSCs 的成脂分化(红油 O)　红色圆形表示成功诱导形成的脂滴;B:BMSCs 的成骨分化(碱性磷酸酶)　蓝紫色区域显示碱性磷酸酶染色阳性;C:BMSCs 的成骨分化(茜素红)　黑红色团块显示矿化结节形成

图 2　BMSCs 的成脂、成骨诱导分化染色观察

2.4 接种密度对BMSCs生长的影响

按常规的1:2传代接种(接种密度为较高的$3\times10^4/cm^2$)培养至3~4 d,细胞再次达90%融合,此时由于细胞密度高,单个细胞轮廓不明显,宽大扁平细胞胞体相互重叠,但是仍可以形成漩涡状的趋势。而将细胞以常规传代接种密度的1/10($3\times10^3/cm^2$)即低密度接种后,细胞几乎全部为长梭形、纺锤形,形态均一,活力好,仅在个别细胞相对稀疏的区域见到个别宽大扁平细胞,且由于接种密度较低,细胞形成漩涡状趋势更加明显(图3)。



A:高密度接种培养后4 d;B:低密度接种培养后4 d

图3 倒置相差显微镜观察不同密度接种培养的第4代BMSCs细胞生长情况

2.5 集落形成单位实验

2组细胞接种在6孔板生长10 d后,分别有圆形克隆形成,克隆边缘不整齐。维持高密度传代接种的细胞平均每孔形成(1.00±0.89)克隆,克隆形成率为(0.20±0.18)%,且克隆内细胞形态不均一,宽大扁平细胞较多,克隆面积为(1.85±0.83)mm^2;而维持在低密度传代接种的细胞每孔形成144.00±25.61克隆,克隆形成率为(28.80±5.00)%,面积为(3.81±0.46)mm^2,2组细胞形成的克隆数目、克隆形成率及克隆面积差异均有统计学意义($P<0.01$,图4)。

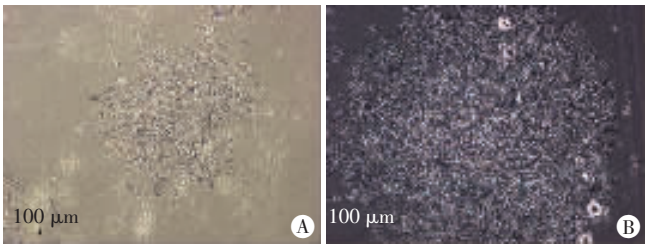


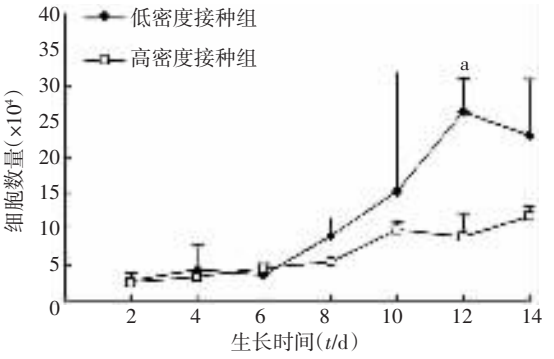
图4 高密度(A)和低密度(B)接种培养的细胞形成的克隆观察 (吉姆萨)

2.6 细胞生长曲线

2组细胞的生长曲线如图5所示。在相同的培养条件下,维持在低密度下传代培养获得的细胞其生长速度比维持在高密度传代培养的细胞更快。2组细胞在接种后的6 d内均处于滞留期,细胞数量变化不大,而低密度接种的细胞在第6天开始进入对数期,直至第12天,细胞数量剧增,最高时达到(28.18±4.77)$\times10^4$,到14 d时即进入平台期;而高密度接种的细胞虽然也在第6天进入对数期,但是仅维持4 d,且细胞数量增加明显较低密度接种组少,最高时细胞数目为(9.88±1.06)$\times10^4$($P<0.05$),第10天即开始进入平台期,细胞增殖减缓。

2.7 细胞周期检测

我们对在不同接种密度条件下获得的5代细胞分别进行了细胞周期分析。结果表明,2组细胞所处的各周期比例明显不同,低密度接种细胞的二倍体期即G_1期的细胞占(54.02±1.60)%,四倍体期即$S+G_2/M$期的细胞占(45.98±1.60)%;而高密度接种细胞的二倍体期即G_1期的细胞占(67.84±1.35)%,四倍体期即$S+G_2/M$期细胞占(32.16±1.35)%。2种细胞的二倍体期及四倍体期细胞比例差异均有统计学意义($P<0.01$)。



a:$P<0.05$,与高密度接种比较

图5 2组细胞的生长曲线比较

3 讨论

BMSCs是应用前景十分广阔的种子细胞。自从Friedenstein[8]首次报道这种来源于骨髓并可以定向分化为骨细胞的干细胞以来,人们相继发现它还具有成脂、成软骨分化的能力[4],甚至在新近的研究中人们还发现它可以向内胚层及外胚层的细胞分化[9,10],因此有人建议将其改名为骨髓基质细胞[11]更为确切。前期的临床试验表明,BMSCs的应用潜力不可估量。目前已经有相当数量的试验将其用于治疗造血干细胞移植后移植物抗宿主疾病[12]、器官移植后的排斥反应[13]、儿童Ⅲ型骨形成障碍[14]等。这些理想结果也迫使人们更加关注如何在体外快速培养出大量优质细胞以供更多临床试验前期的动物实验需求。有学者选用更为年幼的动物取材[15]以获得增殖能力更强的BMSCs;有学者通过控制胰酶消化时间来除去污染的杂细胞[1]。然而在整个原代BMSCs培养过程中,如何保持其活力最佳目前仍少见报道。我们将细胞以低密度传代接种($3\times10^3/cm^2$),并利用干细胞的成克隆性,将形成的"克隆"周边的杂细胞机械擦除,成功获得了形态均一、活力佳、增殖能力更强的BMSCs。

在我们的实验中,以常规的较高密度进行传代接种的细胞在经过一段时间的培养后,形态发生了变化:均一性变差,部分细胞变得宽大且扁平;折光性减弱,细胞没有立体感;增殖速度相对缓慢。并且随着培养时间的延长,这种宽大扁平细胞的比例会增高,而增殖旺盛的立体感好的成纤维样细胞减少。对于这种形态上呈现宽大扁平样的细胞,学术界主要有2种观点:一

是认为这是骨髓中存在的基质细胞(stromal cells),其主要功能是支持骨髓中造血系、间质系细胞的生长和功能,并且可以在体外 MSC 培养中作为伴随其生长但不影响其功能的细胞存在于培养体系中[11]。二是有学者认为这些细胞是衰老的 MSC[16]。由于体外环境的变化导致部分 MSC 不能再保持其良好的干细胞特性,而进入衰老阶段,在自我更新及多向分化的能力上明显衰退,而在形态上就呈现为活力较差细胞的普遍形态,即宽大扁平。而当我们采用较低密度将细胞接种培养后,约至接种后 4 d,细胞形成境界较为清晰的单一"克隆","克隆"内的细胞形态均一、折光性好、立体感明显。随着培养时间的延长,不可避免地在"克隆"间有宽大扁平细胞出现,但是其比例已经明显较常规高密度传代接种的细胞低,并且通过将其机械性擦除,再次传代培养,所获得的细胞的均一性更好。不仅在形态上,在生物学行为上这些细胞同样表现出良好的干细胞特性:从克隆形成单位的实验结果可以看出:克隆形成率达到 25.03%,是高密度接种培养细胞的 210 倍;2 组细胞的生长曲线和细胞周期分析结果也印证了这一结果:以低密度接种的细胞培养 14 d 后细胞数量增加为原始数量的 25 倍,是高密度接种组培养 14 d 后细胞数量的 3 倍;处于 $S + G_2/M$ 期的细胞比例是高密度培养细胞的 143%。这表明我们的方法不仅可以降低经济成本、大幅度缩减纯化筛选时间,而且获得了生物学行为更佳的 BMSCs,更为重要的是,我们可以在短时间内获得数量充足的高纯度、低代次 BMSCs,为后续的体内实验奠定了良好的基础。

事实上,我们在优化 BMSC 的培养条件时还进行了多种尝试:如在原代细胞接种的 8、14、20 h 分别进行首次换液,但是贴壁细胞的数量并未随首次换液时间的延后增多,并且过早换液会导致细胞所处环境改变剧烈不利于细胞生长;在原代培养时将新鲜的含有红细胞的骨髓细胞原液稀释 100 倍后再接种则非但不会形成单细胞克隆反而会直接导致没有细胞贴壁而致原代培养失败;而在小鼠 BMSCs 培养中具有明确抑制造血干细胞污染的 RPMI1640 培养基[17]在大鼠BMSCs 培养中会造成细胞营养不足而无法正常生长(数据未显示)。相比传统的将细胞悬液无限稀释进行单克隆挑选的方法,我们所采用的低密度接种后擦除宽大细胞的方法则更节约了时间并且增大了成功的几率,建立了一种在体外迅速、大量获得较纯净间充质干细胞的方法,这无疑也会为更多的动物实验提供更有利的支持。

参考文献:

[1] 赵春华. 干细胞原理、技术与临床[M]. 北京:化学工业出版社, 2006:63, 334.

[2] Zhang L, Chan C. Isolation and enrichment of rat mesenchymal stem cells (MSCs) and separation of single-colony derived MSCs[J]. J Vis Exp, 2010, 22(37):1852.

[3] 李芙蓉, 张莹, 王代红, 等. 三维立体培养 SD 大鼠骨髓间充质干细胞的研究[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(12):1140-1143.

[4] Curran J M, Chen R, Hunt J A. Material induced mesenchymal stem cell differentiation[J]. Biomaterials, 2010, 31(6):1463-1464.

[5] Reger R L, Tucker A H, Wolfe M R. Differentiation and Characterization of Human MSCs[M]//Prockop D J, Phinney D G, Bunnell B A. Mesenchymal Stem Cells:Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology 449). Totowa:Humana Press, 2008:93-107.

[6] Shetty P, Cooper K, Viswanathan C. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potentials of cord matrix, cord blood, and bone marrow mesenchymal stem cells [J]. Asian J Transfus Sci, 2010, 4(1):14-24.

[7] Javazon E H, Colter D C, Schwarz E J, *et al*. Rat marrow stromal cells are more sensitive to plating density and expand more rapidly from single-cell-derived colonies than human marrow stromal cells[J]. Stem Cells, 2001, 19(3):219-225.

[8] Friedenstein A J, Gorskaja J F, Kulagina N N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs[J]. Exp Hematol, 1976, 4(5):267-274.

[9] Ball S G, Shuttleworth C A, Kielty C M. Platelet-derived growth factor receptors regulate mesenchymal stem cell fate:implications for neovascularization[J]. Expert Opin Biol Ther, 2010, 10(1):57-71.

[10] Park H W, Lim M J, Jung H *et al*. Human mesenchymal stem cell-derived Schwann cell-like cells exhibit neurotrophic effects, *via* distinct growth factor production, in a model of spinal cord injury[J]. Glia, 2010, 58(9):1118-1132.

[11] Prockop D J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues[J]. Science, 1997, 276(5309):71-74.

[12] Ball L M, Bernardo M E, Roelofs H, *et al*. Cotransplantation of ex vivo expanded mesenchymal stem cells accelerates lymphocyte recovery and may reduce the risk of graft failure in haploidentical hematopoietic stem-cell transplantation[J]. Blood, 2007, 110(7):2764-2767.

[13] Crop M J, Baan C C, Korevaar S S, *et al*. Donor-derived mesenchymal stem cells suppress alloreactivity of kidney transplant patients [J]. Transplantation, 2009, 87(6):896-906.

[14] Niyibizi C, Li F. Potential implications of cell therapy for osteogenesis imperfecta[J]. Int J Clin Rheumtol, 2009, 4(1):57-66.

[15] Scutt A, Kollenkirchen U, Bertram P. Effect of age and ovariectomy on fibroblastic colony-forming unit numbers in rat bone marrow[J]. Calcif Tissue Int, 1996, 59(4):309-310.

[16] Colter D C, Sekiya I, Prockop D J. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(14):7841-7845.

[17] Peister A, Mellad J A, Larson B L, *et al*. Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential [J]. Blood, 2004, 103(5):1662-1668.

(收稿:2010-06-06 修回:2010-07-16)

(编辑 张 维)