



^3H -TdR标记人骨髓间充质干细胞移植治疗mdx鼠的实验研究

假肥大型肌营养不良症(Duchenne muscular dystrophy, DMD)是一种以骨骼肌进行性变性、坏死为主要病理特征的致死性的X-性连锁隐性遗传性肌病,发病机制是营养障碍基因(dystrophin, Dys)突变,导致骨骼肌功能严重受损,目前尚无有效的治疗方法。体外研究发现人骨髓干细胞可诱导分化为表达Dys的细胞[1];已有研究用小鼠或大鼠骨髓间充质干细胞移植治疗肌营养不良(mdx)模型鼠,结果发现mdx鼠的骨骼肌部分表达Dys[2]。但这些研究尚不能证明mdx鼠中表达Dys的骨骼肌是由移植的干细胞分化而来。为此,我们用氚-脱氧胸腺嘧啶(^3H -TdR)标记人骨髓间充质干细胞(hBM-MSc)移植治疗型mdx鼠,了解mdx鼠中表达Dys的骨骼肌是否由移植的干细胞分化而来;探讨干细胞在移植鼠体内的分布特点,为干细胞的临床应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物 mdx鼠购于美国Maine州的Jackson实验室(动物入境检疫许可证号为AD44010011),子代mdx鼠为纯合子mdx鼠配种后繁殖;36只8~10周mdx鼠,体质量20~23 g,雌雄不限;C57鼠,8~10周,18只作为对照组,体质量20~25 g,由中山大学中山医学院动物实验中心(动物合格证号为2001A027)提供。

1.1.2 试剂与仪器 ^3H -TdR由中国科学院原子能研究所提供,放射活度为 3.7×10^{10} Bq/ml。高氯酸(天津市鑫源化工厂),闪烁剂(Sigma),无水乙醇(汕头市先华化学厂),恒温水浴箱(北京设备厂),液闪计数器(美国Packard)。

1.2 实验方法

1.2.1 hBM-MSc培养和纯化 无菌条件下,取健康成人骨髓约20 ml,以淋巴细胞分离液通过密度梯度法分离单个核细胞(MNC)并以PBS洗2次;以 1×10^6 /ml的密度接种于含10%胎牛血清、1%谷氨酰胺的DMEM/F12培养基(T-25培养瓶)中,置37℃、5%的CO₂、饱和湿度的孵箱内培养。每3~4 d换液1次,细胞长到80%融合时,用1:1的2.5 g/L胰蛋白酶和0.2 g/L EDTA混合液消化,以1:2的比例传代培养。

1.2.2 ^3H -TdR标记hBM-MSc 取第5代hBM-MSc以每瓶细胞掺入 ^3H -TdR 1uCi (3.7×10^7 Bq),使其随细胞的分裂增殖掺入细胞DNA,72 h后用1:1的2.5 g/L胰蛋白酶和0.2 g/L EDTA混合液消化、收集干细胞以备移植。

1.2.3 hBM-MSc移植mdx鼠 实验鼠分为3组:(1) C57鼠(18只);(2) mdx移植鼠(18只);(3) mdx未移植鼠(18只)。实验鼠均予6 Gy的 γ 射线全身照射以抑制免疫;(1)、(2)组均以每只鼠 1×10^7 hBM-MSc细胞(0.3 ml,放射性计数为 5.4×10^5 Bq)经尾静脉注入;(3)组为空白对照组,经尾静脉注入0.3 ml PBS。

1.2.4 体内干细胞分布 于移植后24 h、48 h、2周、1月、2月、4月处死鼠(每一时间点3只鼠),取其外周血、心、肝、脾、肺、肾、胃、小肠、脑、肌肉、骨髓等组织、器官,各取50~100 mg(湿重)组织样品置于玻璃试管中,先加高氯酸0.1 ml消化约20 min,然后加入30%双氧水0.2 ml振荡混匀,盖上瓶塞放入

75 °C~80 °C恒温水箱中消化2 h至其变为无色清澈液，取出冷却。加入5 ml闪烁剂(7 g闪烁剂PPO溶于1 L二甲苯中)，再加入4 ml无水乙醇及1滴VitC，摇匀，避光静置5 h后用液闪仪测量，计算出单位重量的放射性计数(cpm/mg)。

1.2.5 移植鼠骨骼肌 Dys/utrophin(Utr)免疫荧光检测 取腓肠肌组织约1 cm ×0.5 cm ×0.5 cm 大小，放入预冷的异戊烷3~5 s 后，浸入液氮中冷冻；冰冻切片，厚5 μm。然后行Dys、Utr免疫荧光双染检测：(1)10%BSA封闭，室温20 min；(2)甩干后，滴加鼠抗人Dys一抗(NCL-DYS3, Novocastra;1:40)，湿盒内37 °C孵育2 h；(3)滴加山羊抗鼠-FITC二抗(博士德生物工程有限公司，1:100)，37 °C孵育30 min。(4)正常兔封闭血清(1:20)，室温20 min；(5)滴加山羊抗鼠Utr一抗(Santa Cruz Biotech, 1:100)，4 °C孵育过夜；(6)滴加生物素-兔抗羊二抗(博士德生物工程有限公司，1:100) 37 °C孵育20 min；(7)滴加亲生物素-Cy3(1:100)，室温20 min。用共聚焦成像系统观察结果，与Dys抗体结合的的荧光FITC其激发波长为490~495 nm，在520~530 nm发射荧光，呈绿色；与Utr抗体结合的荧光Cy3其激光激发波长为554 nm，在568~574 nm发射荧光，呈红色；如果两种抗体均存在，则Cy3与FITC染色均呈阳性，共聚焦时的颜色为亮黄色。以健康成人骨骼肌作为阳性对照；阴性对照为PBS替代Dys一抗。 每只鼠肌切片在荧光显微镜下连续观察10个视野，记数Dys免疫荧光着色阳性肌纤维占全部视野肌纤维的比例，然后算出3只鼠Dys免疫荧光阳性率。

1.3 统计分析

测定结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示；组间比较用方差分析(SPSS 10.0 for Windows)。

2 结果

2.1 移植鼠不同时点各器官放射活性

移植mdx 鼠后48 h以肝、脾、骨髓、胃肠放射性计数增高为主；2 周以骨髓、肝、脾、胃肠、肌肉增高为主；1月以骨髓、肝、肌肉增高为主；2月后以骨髓、肌肉增高为主(表1)。移植C57鼠后2 周内以肝、脾、骨髓、胃肠放射性计数增高为主；1月之后仅肝放射性计数稍高，而骨髓放射性计数仍较高(表2)。移植mdx 鼠与C57鼠不同时点心、肌肉、脑、骨髓放射活性比较见表3。

表1 移植鼠不同时点各器官放射活性 (n=3,Bq/mg, $\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Radioactivity of ³H-hymidine in the organs of mdx mice with hBM-MSCTransplantation (n=3,Bq/mg,Mean ±SD)

Tissue andorgan	Timeaftertransplantation					
	24 h	48 h	2 weeks	1 month	2 months	4 months
Blood	30.42±2.53	8.75±2.12	3.15±0.81	1.84±0.63	1.29±0.56	0.97±0.48
Heart	4.99±0.67	6.84±1.10	8.93±0.94	7.42±0.84	4.85±0.73	4.47±0.45
Liver	44.47±10.46	68.74±14.28	34.37±6.24	20.25±2.78	8.43±1.43	5.74±1.05
Spleen	25.47±6.87	77.45±16.48	18.96±0.88	7.24±0.67	4.78±0.76	4.57±0.85
Lung	6.78±1.04	6.21±0.57	4.04±0.69	3.27±0.86	4.12±0.34	2.75±0.39
Kidney	4.73±0.87	3.89±0.39	3.25±0.64	2.33±0.54	1.45±0.27	1.04±0.19
Stomach	23.56±6.73	27.49±5.48	16.58±3.84	7.89±1.77	4.76±0.82	3.75±0.49
Intestine	20.43±5.25	24.84±3.98	10.36±2.47	5.88±0.92	4.45±0.67	4.02±0.66
Muscle	5.18±1.24	6.28±0.84	14.84±1.36	27.65±3.53	11.22±2.15	6.25±0.65
Brain	3.82±0.48	4.92±0.24	11.86±0.99	10.44±2.04	7.56±1.25	4.32±0.37
Bonemarrow	38.42±7.48	44.52±8.67	58.43±8.99	40.13±4.78	28.49±4.82	13.45±1.37

High level of radioactivity of ³H-hymidine was mainly found in the liver, spleen, bonemarrow and gastrointestinal 48 h after cell transplantation. The radioactivity increased in the bonemarrow, liver, spleen, gastrointestinal, and muscles 2 weeks after transplantation, and the increase was the most manifest in the bonemarrow, liver, and muscle at 1 month and in the bonemarrow and muscle at 2 months after transplantation.

表2 移植鼠不同时点各器官放射活性 (n=3, Bq/mg, $\bar{x}\pm s$)Tab.2 Radioactivity of ^3H -hydridine in the organs of C57 mice with hBM-MSC transplantation (n=3, Bq/mg, Mean \pm SD)

Tissue and organ	Time after transplantation					
	24 h	48 h	2 weeks	1 month	2 months	4 months
Blood	33.12 \pm 2.64	9.15 \pm 1.22	2.25 \pm 0.30	2.05 \pm 0.33	1.76 \pm 0.67	1.09 \pm 0.38
Heart	5.54 \pm 0.62	6.14 \pm 1.24	6.67 \pm 0.73	5.92 \pm 0.58	5.15 \pm 0.64	3.56 \pm 0.51
Liver	58.46 \pm 10.16	64.32 \pm 11.29	28.24 \pm 5.45	9.28 \pm 1.48	8.61 \pm 1.14	4.724 \pm 0.85
Spleen	22.47 \pm 6.87	62.46 \pm 12.48	23.47 \pm 0.52	7.31 \pm 0.57	5.45 \pm 0.81	3.26 \pm 0.55
Lung	8.98 \pm 1.08	6.38 \pm 0.77	3.58 \pm 0.68	3.27 \pm 0.74	2.99 \pm 0.42	2.75 \pm 0.34
Kidney	5.23 \pm 0.57	4.19 \pm 0.37	3.41 \pm 0.57	3.38 \pm 0.44	3.15 \pm 0.56	2.84 \pm 0.39
Gastro	21.86 \pm 4.11	24.26 \pm 4.81	13.28 \pm 1.61	6.53 \pm 0.97	4.76 \pm 0.82	4.10 \pm 0.57
Intestine	18.23 \pm 3.15	21.63 \pm 3.45	12.23 \pm 1.45	4.88 \pm 0.83	4.45 \pm 0.67	3.83 \pm 0.61
Muscle	4.43 \pm 1.14	4.98 \pm 0.74	4.26 \pm 1.06	3.95 \pm 0.42	3.35 \pm 0.34	3.61 \pm 0.43
Brain	3.32 \pm 0.41	5.12 \pm 0.31	6.23 \pm 0.74	6.14 \pm 0.64	5.16 \pm 0.58	4.42 \pm 0.88
Bonemarrow	37.62 \pm 6.95	54.61 \pm 5.69	47.63 \pm 6.52	45.10 \pm 4.67	35.58 \pm 3.84	17.86 \pm 2.58

High radioactivity of ^3H -hydridine was mainly found in the liver, spleen, bone marrow and gastrointestine 2 weeks after transplantation, with moderately high level in the liver and obviously high level in the bonemarrow 1 month after transplantation.

表3 移植鼠不同时点各器官放射活性 (n=3, Bq/mg, $\bar{x}\pm s$)Tab.3 Comparison of ^3H -hydridine radioactivity in the organs of mdx and C57 mice with hBM-MSC transplantation (n=3, cpm/mg, Mean \pm SD)

Organ	Mouse	Time after transplantation					
		24 h	48 h	2 weeks	1 month	2 months	4 months
Heart	Mdx	4.99 \pm 0.67	6.84 \pm 1.10	8.93 \pm 0.94*	7.42 \pm 0.84*	4.85 \pm 0.73	4.47 \pm 0.45*
	C57	5.54 \pm 0.62	6.14 \pm 1.24	6.67 \pm 0.73	5.92 \pm 0.58	5.15 \pm 0.64	3.56 \pm 0.51
Muscle	Mdx	5.18 \pm 1.24	6.28 \pm 0.84**	14.8 \pm 1.36**	27.65 \pm 3.53**	11.2 \pm 2.15**	6.25 \pm 0.65**
	C57	4.43 \pm 1.14	4.98 \pm 0.74	4.26 \pm 1.06	3.95 \pm 0.42	3.35 \pm 0.34	3.61 \pm 0.43
Brain	Mdx	3.82 \pm 0.48	4.92 \pm 0.24	11.8 \pm 0.99**	10.44 \pm 2.04**	7.56 \pm 1.25**	4.32 \pm 0.37
	C57	3.32 \pm 0.41	4.92 \pm 0.24	6.23 \pm 0.74	6.14 \pm 0.64	5.16 \pm 0.58	4.42 \pm 0.88
Bonemarrow	Mdx	38.42 \pm 7.48	44.52 \pm 8.67	58.4 \pm 8.99*	40.13 \pm 4.78	28.49 \pm 4.82	13.45 \pm 1.37
	C57	37.62 \pm 6.95	54.6 \pm 5.69*	47.6 \pm 6.52	45.10 \pm 4.67*	35.5 \pm 3.84**	17.8 \pm 2.58**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ for comparison between mdx mice and C57 mice by analysis of variance

2.2 骨骼肌免疫荧光检测

移植mdx鼠24 h、48 h、2周后肌膜NCL-DYS3免疫荧光呈阴性；1、2、4月后NCL-DYS3免疫荧光呈阳性，为绿色；其utrophin免疫荧光呈红色；共聚焦显微镜呈黄色(图1)，阳性率分别为6.6%、8.4%、8.9%。图2示健康成人骨骼肌dystrophin/utrophin免疫荧光共聚焦成像，肌膜均呈黄色。

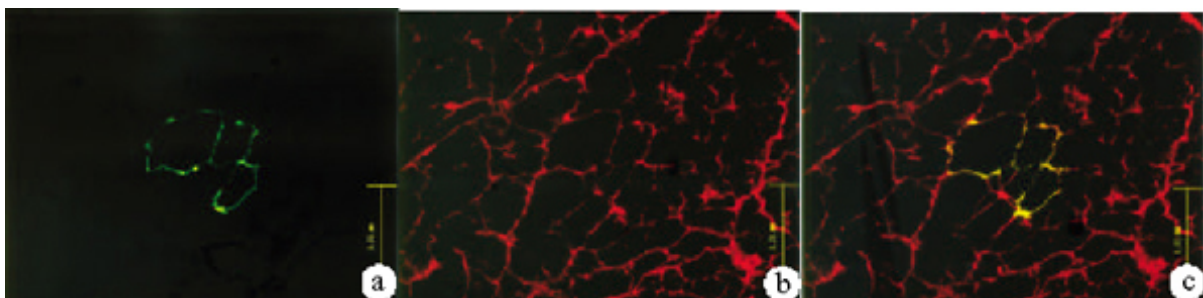


图1 移植mdx鼠2月时肌膜NCL-DYS3/utrophin免疫荧光共聚焦显像

Fig.1 Confocal immunofluorescence images of NCL-DYS3/utrophin-positive cells in the skeletal muscle of mdx mice 2 months after hBM-MSC transplantation (Original)

magnification: $\times 200$)

a: NCL-DYS3 positivity (green) in part of the sarcolemma; b: Utrophin positivity (red) in the entire sarcolemma; c: Co-expression of NCL-DYS3 and utrophin (yellow)

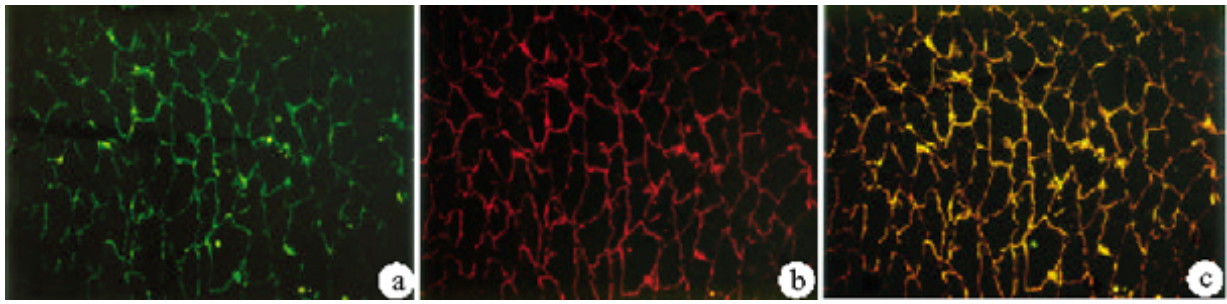


图2 健康成人骨骼肌NCL-DYS3/utrophin免疫荧光共聚焦成像

Fig.2 Confocal immunofluorescence images of NCL-DYS3/utrophin-positive cells in the skeletal muscle of healthy human adult (Original magnification: $\times 200$)

a: NCL-DYS3 positivity (green) in the whole sarcolemma; b: Utrophin positivity (red) in the entire sarcolemma; c: Co-expression of NCL-DYS3 and utrophin (yellow)

3 讨论

3.1 hBM-MSC移植治疗mdx鼠不同时间点干细胞分布特点

国外已有用 ^{111}In -oxine标记干细胞进行体内短期示踪研究[3]，其发出的 γ 射线能量较高，可能造成干细胞染色体的断裂，而且其半衰期仅67 h，远远不能满足mdx鼠干细胞移植治疗需要长期示踪的要求， ^3H -TdR具有稳定掺入DNA并且射线能量低，半衰期长的特点(12.35年)；易测定且放射自显影效果清楚，具有良好的示踪作用，因其标记率高达97%，故其放射计数大小基本可代表干细胞的多少，因此我们选用 ^3H -TdR作为干细胞的示踪剂。本研究结果表明，移植后24 h时mdx鼠中以肝脏含干细胞最高，其后依次为骨髓、血、脾、胃、肠、肺、肌、肾、心、脑，可能因为肝脏、骨髓含血丰富，且骨髓放疗后需要较原始的干细胞造血的缘故——体外研究认为 hBM-MSC尚有支持造血的作用，但随BM-MSC传代次数的增加，其造血支持作用逐渐下降[1][4]。48 h时，脾脏含量最高，肝脏退居第二位，其后依次是骨髓、胃、肠、血、肌肉、心脏等，脾脏含量高可能与异种干细胞的免疫反应有关；2周时干细胞的回巢现象使其在骨髓进一步聚集，骨髓中放射活性最高，肝、脾、胃、脑、肠等部位的干细胞向骨髓、心肌、肌肉转移，含量开始下降，所占比例缩小，而肌肉和心肌放射含量比例提高；在1、2、4月时各器官除肌肉外放射性进一步下降，但骨髓含量仍较高。由此我们推论，移植后早期(24 h~2周)，干细胞分布于多数组织、器官，其中以骨髓、肝、肺、脾的分布更多；2周后干细胞向骨髓回巢使其在骨髓大量聚集，多数器官干细胞分布随时间推移逐渐下降；并逐渐植入骨骼肌，于1月时达到高峰，但此时尚未分化为肌细胞或分化为肌细胞的很少；之后才逐渐分化为肌细胞，2月后分化的肌细胞逐渐增多，并持续至20、24周。

3.2 mdx鼠与C57鼠部分器官放射活性分布不同

心脏的放射计数在24 h、48 h、2月时两者无统计学意义($P>0.05$)，而在2周、1月、4月时具有显著统计学意义($P<0.01$)；在肌肉中其放射性计数除24 h外其余时间点两者比较均有极显著的统计学意义($P<0.01$)；在脑中其放射性计数在24 h、48 h、4月两者比较无统计学意义，而在2周、1月、2月时间点时有极显著统计学意义($P<0.01$)。结果表明随着时间的延长，hBM-MSC有向mdx鼠受损部位(骨骼肌)迁移的特点，提示干细胞可能在此部位分化为肌细胞；免疫荧光检测显示移植1月、2月、4月后Dys免疫荧光呈阳性，进一步证明移植mdx鼠Dys阳性肌细胞来源hBM-MSC；多数学者认为[5][6]，体内微环境、细胞与细胞接触、细胞内基质在决定干细胞定向分化为特定体细胞中发挥重用作用。2周时mdx鼠骨髓放射活性含量比C57鼠高，这说明进入mdx鼠的干细胞回巢快、骨髓重建快；在其余时间点除24 h两者无统计学意义外，C57鼠骨髓放射

活性比mdx鼠高($P < 0.05$), 说明两者的hBM-MSc向骨髓回巢后再转化为其它(肌)细胞的能力不同, mdx鼠需要干细胞不断分化移动去补充凋亡坏死的各种细胞, 干细胞动员得比C57鼠快, 所以骨髓的放射性含量下降也快。

3.3 hBM-MSc可部分修复骨髓肌肌膜病变

体外研究[7]表明骨髓间质干细胞在体外诱导(用5-氮杂胞苷)能分化为肌样细胞; 未经诱导的骨髓间质干细胞也表达成肌调节因子MyoD, Myf5, myogenin。本实验采用NCL-DYS3抗体检测移植mdx鼠肌膜Dys的表达; NCL-DYS3抗体系抗人类Dys氨基端NCL-DYS的单克隆抗体, 是抗人类Dys的特异性抗体, 不与鼠肌膜Dys起免疫反应[6][8]; 因此mdx鼠肌膜NCL-DYS3阳性肌细胞系hBM-MSc分化而来。本实验结果发现人骨髓干细胞移植治疗mdx鼠后随疗程延长肌纤维Dys阳性率逐渐增高(移植1月、2月、4月肌纤维Dys免疫荧光阳性率分别为6.6%、8.4%、8.9%)。与骨骼肌 $^3\text{H-TdR}$ 放射活性分布动态变化特点一致, 证明hBM-MSc能植入mdx鼠体内, 并分化为骨骼肌, 部分修复骨髓肌肌膜病变。但2周时骨骼肌 $^3\text{H-TdR}$ 放射活性较高而Dys免疫荧光呈阴性, 原因可能是干细胞虽植入骨骼肌, 但尚未分化为肌细胞, 所以肌膜不表达Dys。有研究[6]人骨髓干细胞移植治疗NOD/RAG鼠后, 发现mdx鼠肌肉每张切片中人Dys阳性肌纤维达 14.1 ± 3.6 个(干细胞植入率0.26%); 提示hBM-MSc分化为骨骼肌的能力比全骨髓干细胞强, 也说明mdx鼠的肌肉病变对MSc有更强的趋化性; 在Chen[9]的实验中观察到人骨髓干细胞治疗脑缺血时, 脑缺血局对干细胞趋化引导作用, 机制尚不清楚。虽然有研究[10]认为鼠造血干细胞和间充质干细胞都能分化为骨骼肌细胞, 但也有研究[11]认为造血干细胞分化为骨骼肌细胞的能力有限。本研究表明hBM-MSc移植有可能成为DMD的一种有效治疗手段。

参考文献:

- [1] Reyes M, Lund T, Lenvik T, et al. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells[J]. *Blood*, 2001, 98: 2615-25.
- [2] 张为西, 张成, 刘焯霖, 等. Duchenne肌营养不良模型鼠骨髓移植后dystrophin的表达[J]. *中华神经科杂志*, 2002, 35(10): 358-60.
Zhang WX, Zhang C, Liu ZL, et al. Dystrophin expression in mdx mouse restored by bone marrow transplantation[J]. *Chin J Neurol*, 2002, 35(10): 358-60.
- [3] Gao JZ, Dennis JE, Muzic RF, et al. The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion[J]. *Cells Tissues Organs*, 2001, 169: 12-20.
- [4] 林竟韧, 郭坤元, 严定安. 人骨髓基质干细胞克隆对脐血造血干细胞体外扩增作用的研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2003, 13(6): 8-11.
Lin JR, Guo KY, Yan DA. A study on the clone culture of human bone marrow mesenchymal stem cells(hMSCs) and their ex vivo support affect on hematopoiesis [J]. *Chin J Mod Med*, 2003, 13(6): 8-11.
- [5] Watt FM, Ogan BL. Stem cells and their niches[J]. *Science*, 2000, 287: 1427-30.
- [6] Bossolasco P, Corti S, Strazzer S, et al. Skeletal muscle differentiation potential of human adult bone marrow cells[J]. *Exp Cell Res*, 2004, 295: 66-78.
- [7] 曾纓, 张成, 刘克玄, 等. 成肌调节因子MyoD与myogenin在肌肉损伤修复过程的动态变化[J]. *第一军医大学学报*, 2004, 24(5): 542-5.
Zeng Y, Zhang C, Liu KX, et al. Dynamic changes in the expressions of myogenic regulatory factors MyoD and myogenin during repair of muscle injury[J]. *J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 2004, 24(5): 542-5.
- [8] Altmannsberger M, Weber K, Droste R, et al. Desmin is a specific marker for rhabdomyo-sarcomas of human and rat origin[J]. *Am J Pathol*, 1985, 118: 85-95.
- [9] Chen J, Sanberg PRY, Li Y, et al. Intravenous administration of human umbilicalcord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats[J]. *Stroke*, 2001, 32: 2682-8.

[10] Corti S, Strazzer S, Del Bo R, et al. A subpopulation of murine bone marrow cells fully differentiate along the myogenic pathway and participates in muscle repair in mdx dystrophic mouse[J]. *Exp Cell Res*, 2002, 277: 74-85.

[11] Camargo FD, Green R, Capetenaki Y, et al. Single hematopoietic stem cells generate skeletal muscle through myeloid intermediates[J]. *Nat Med*, 2003, 9:1520-27.

参考文献:

[1] Reyes M, Lund T, Lenvik T, et al. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells[J]. *Blood*, 2001, 98: 2615-25.

[2] 张为西, 张成, 刘焯霖, 等. Duchenne 肌营养不良模型鼠骨髓移植后dystrophin 的表达[J]. *中华神经科杂志*, 2002, 35(10): 358-60.

Zhang WX, Zhang C, Liu ZL, et al. Dystrophin expression in mdx mouse restored by bone marrow transplantation[J]. *Chin J Neurol*, 2002, 35(10): 358-60.

[3] Gao JZ, Dennis JE, Muzic RF, et al. The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion[J]. *Cells Tissues Organs*, 2001, 169: 12-20.

[4] 林竟初, 郭坤元, 严定安. 人骨髓基质干细胞克隆对脐血造血干细胞体外扩增作用的研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2003, 13(6): 8-11.

Lin JR, Guo KY, Yan DA. A study on the clone culture of human bone marrow mesenchymal stem cells(hMSCs) and their ex vivo support affect on hematopoiesis [J]. *Chin J Mod Med*, 2003, 13(6): 8-11.

[5] Watt FM, Ogan BL. Stem cells and their niches[J]. *Science*, 2000,287: 1427-30.

[6] Bossolasco P, Corti S, Strazzer S, et al. Skeletal muscle differentiation potential of human adult bone marrow cells[J]. *Exp Cell Res*, 2004, 295: 66-78.

[7] 曾纓, 张成, 刘克玄, 等. 成肌调节因子MyoD与myogenin在肌肉损伤修复过程的动态变化[J]. *第一军医大学学报*, 2004, 24(5): 542-5.

Zeng Y, Zhang C, Liu KX, et al. Dynamic changes in the expressions of myogenic regulatory factors MyoD and myogenin during repair of muscle injury[J]. *J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 2004, 24(5): 542-5.

[8] Altmannsberger M, Weber K, Droste R, et al. Desmin is a specific marker for rhabdomyo-sarcomas of human and rat origin[J]. *Am J Pathol*, 1985, 118: 85-95.

[9] Chen J, Sanberg PRY, Li Y, et al. Intravenous administration of human umbilicalcord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats[J]. *Stroke*, 2001, 32: 2682-8.

[10] Corti S, Strazzer S, Del Bo R, et al. A subpopulation of murine bone marrow cells fully differentiate along the myogenic pathway and participates in muscle repair in mdx dystrophic mouse[J]. *Exp Cell Res*, 2002, 277: 74-85.

[11] Camargo FD, Green R, Capetenaki Y, et al. Single hematopoietic stem cells generate skeletal muscle through myeloid intermediates[J]. *Nat Med*, 2003, 9:1520-27.