

三种不同型别小鼠骨髓来源间质干细胞的生物学特性分析

惠大阳^{1,2}, 郭振宇³, 卢志杰⁴, 余伟华¹, 王涛¹, 雷俊霞^{1,2*}

(中山大学 1.中山大学干细胞与组织工程中心, 2.中山医学院病理生理教研室, 广东 广州 510080; 3.附属第五医院泌尿外科, 广东 珠海 519000; 4.广东医学院附属第一医院放疗科, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】间质干细胞(MSC)是一种间质来源的多潜能基质细胞,目前人和多种动物来源的 MSC 均已被成功分离鉴定。然而由于小鼠骨髓 MSC 的分离相对人和其他物种更为困难,关于小鼠骨髓 MSC 的克隆分析结果也相对有限且结果不尽一致。为此,本研究拟进一步探讨小鼠 MSC 的体外分离方法,并对 MSC 克隆形成单位进行生物学特性分析。【方法】取 C57BL/6 小鼠,冲洗股骨骨髓腔获得骨髓单个核细胞悬液,低密度接种培养,并通过有限稀释克隆挑选获得三种形态、生长特点不同的克隆形成单位(CFU)。采用流式分析技术对三种类型的 CFU 进行表型分析,并用油红 O 和茜素红分别进行成脂和成骨分化诱导鉴定。【结果】低密度培养并结合克隆化培养分离技术成功获得 C57BL/6 小鼠骨髓间充质干细胞,并观察到偏圆形(MSC1)、长梭形(MSC2)以及纺锤形、多边形(MSC3)三种贴壁形态细胞类型;免疫表型分析显示,三种细胞均强表达 Sca-1,不表达 CD11b、CD45,部分表达 CD90.2;体外诱导分化实验证实, MSC1 仅具有向脂肪细胞分化的潜能, MSC2 仅具有向成骨细胞分化的潜能; MSC3 则具有成骨、成脂双向分化能力。【结论】低密度培养并结合克隆化培养分离技术可成功分离小鼠骨髓间充质干细胞;小鼠 MSCs 是一种高度异质性的细胞群,其中可能含有多能 MSC 或单一分化方向的前体细胞等处于不同分化阶段的细胞类型。

关键词:骨髓; 间充质干细胞; 小鼠; 生物学特性

中图分类号: R329.28

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2011)02-0169-06

Biological Characteristics Analysis of Three Types of Murine Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells

HUI Da-yang^{1,2}, GUO Zhen-yu³, LU Zhi-jie⁴, YU Wei-hua¹, WANG Tao¹, LEI Jun-xia^{1,2*}

(1.Center for Stem Cell Biology and Tissue Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 2.Department of Pathophysiology, Zhongshan Medical College, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 3.Department of Urinary Surgery, The Fifth Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Zhuhai 519000, China; 4.Department of Radiotherapy, The First Affiliated Hospital of Guangdong University of Pharmacy, Guangzhou 510080, China)

Abstract:【Objective】 Mesenchymal stem cells (MSC) are multipotential stromal cells. Now the MSC of human and many animals have been isolated and identified successfully. However, the isolation of purified murine MSC from bone marrow is far more difficult than that in human and other species, so the clonal analysis results of murine bone marrow MSC are limited and even inconsistent. Therefore, isolation of pure murine MSC in vitro and identification of the biological characteristics of colony-forming units (CFU) were further studied. 【Methods】 Mononuclear cells flushed from thigh bone marrow cavity of C57BL/6 mouse were plated at low density. Three types of CFU with different morphology and proliferation characteristics were acquired by limiting dilution and cloning selection. The immunophenotype of these three types of CFU were analyzed by flow cytometry and the osteogenic differentiation and adipocytic differentiation potential were identified by Alizarin red staining and Oil Red O staining. 【Results】 Thus, by low density culture system combined with cloning isolation technique, we totally obtained three distinct clonal MSC populations from C57BL/6 mouse bone marrow. These cell lines exhibited different morphology: MSC1 had a near round morphology, while MSC2 presented a typical fibroblast-like morphology and MSC3 had fusiform and polygonal morphology. These three cell populations were all

收稿日期: 2011-01-07

基金项目: 广东省医学科研基金(05300604)

作者简介: 惠大阳, 在读硕士研究生, E-mail: 249876466@qq.com; * 通信作者: 雷俊霞, 医学博士, 讲师, E-mail: leijsx@mail.sysu.edu.cn

strong positive for stem cell antigen-1 (Sca-1), negative for CD11b and CD45 and partially positive for CD90.2. Differentiation potential assay showed that MSC1 could only be induced to adipocyte and MSC2 only to osteoblast, while MSC3 could differentiate to adipocyte and osteoblast.【Conclusions】 Low density culture system combined with cloning isolation technique could isolate mouse mesenchymal stem cells successfully. Mouse MSC are highly heterogeneous cell populations which may contain multi-potential MSC or uni-potential progenitors at different developmental stages.

Key words: bone marrow; mesenchymal stem cells; murine; biological characteristics

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2011, 32(2): 169-174]

间质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)是一种多潜能间质来源的基质细胞。在适宜的培养条件下它可增殖并被诱导分化成包括骨、软骨、肌肉、脂肪、神经等组织细胞。其多向分化潜能以及方便地在体外扩增的特点,使 MSC 首先被尝试用于细胞移植和组织修复治疗^[1]。此外 MSC 独特的免疫调节作用,使之已被用于自身免疫病和移植物抗宿主病(graft versus host disease, GVHD)的治疗^[2-3]。但是由于 MSC 缺乏特异标志,目前 MSCs 的分离主要还是根据其粘附性,并进一步通过形态及多向分化能力鉴定,因而不同实验室获得的 MSCs 可能并非均一,从而使报道的治疗效果也并非一致^[4]。小鼠种系完善且容易建立多种疾病模型,因此进一步探讨小鼠 MSC 的分离培养,尤其是进行克隆化培养的 MSC 生物学特性鉴定,将对研究 MSC 的应用具有重要意义。为此,我们采用低密度培养,并结合克隆化培养分离技术,获得了三种不同型别的小鼠 MSC,结果发现其形态、生长特点和分化能力均有差异。

1 材料与方 法

1.1 实验动物与主要试剂

胎牛血清购于北京元亨圣马生物技术研究所; L-DMEM 培养基、胰蛋白酶购于 Gibco 公司; MSC 诱导药物地塞米松、胰岛素、 β -磷酸甘油钠、维生素 C 及染色试剂油红 O、茜素红购于 Sigma 公司; PE-anti mouse CD45、CD90.2, PE-cy7-anti mouse CD11b, APC-anti mouse Sca-1 四种流式抗体购于 eBioscience 公司; 4-6 周 C57BL/6 小鼠由中山大学实验动物中心提供。

1.2 小鼠骨髓间质干细胞的分离培养与传代扩增

取 C57BL/6 小鼠,颈椎脱臼处死,放于体积分数为 75%的乙醇中浸泡 5 min,无菌状态下取出双侧股骨,在冰上仔细去除股骨上附带组织,用注射

器吸取含 100 mL/L FCS 的 L-DMEM 培养基,冲出骨髓腔中细胞,通过 200 目不锈钢网,收集细胞,用 Tris-NH₄Cl 溶解红细胞 2 min,离心去上清,用含 100 mL/L FCS 的 L-DMEM 培养基重悬并调整细胞浓度,按 500 个细胞/孔的密度接种于 24 孔板,置于 37 ℃、体积分数为 5%的 CO₂ 培养箱中,7 d 后第 1 次换液,此后每 3 d 换液 1 次,待细胞有小的细胞克隆形成时,消化收集小克隆,转移至 6 孔板,每 3 d 换液 1 次,待细胞 70%~80%融合时,消化转移至培养瓶,此为第 2 代细胞。继续培养,细胞传至第 6 代细胞增殖速度稳定后,在 6 孔板中将细胞悬液有限稀释使细胞生长形成边界清晰的细胞克隆,采用尖吸管将细胞克隆逐一挑起并分别接种于 12 孔板,待细胞 70%~80%融合后,消化转移至 6 孔板,并进一步转移至培养瓶规律传代。

1.3 小鼠骨髓间质干细胞的表型分析

选择第 10 代培养细胞,消化制备单细胞悬液,用不含胎牛血清的培养基悬浮细胞,调整浓度为 1×10^6 /mL,立刻进行细胞标记。向收获的细胞中分别加入荧光素标记的抗体 PE-anti mouse CD45、CD90.2, PE-cy7-anti mouse CD11b, APC-anti mouse Sca-1,摇匀,避光 4℃冰箱放置 20 min。 $244 \times g$ 离心 10 min,弃去上清液, PBS 冲洗 2 次,加多聚甲醛固定液 450 μ L 固定,待上机检测。所有标本均在 6 h 内完成标定。以流式细胞仪的配套软件 Cell Quest Ver3.0 分析样本中 1×10^4 个细胞的阳性表达率。每个样本均设同型标记抗体作为阴性对照。

1.4 小鼠骨髓间质干细胞的多向分化潜能鉴定

1.4.1 成骨诱导 常规消化传代,以 1×10^5 /孔的密度接种于 6 孔培养板中。当骨髓间质干细胞长至 80%融合时,将培养基更换为含 100 mL/L 胎牛血清、 10^{-8} mol/L 地塞米松、50 μ g/mL 维生素 C、10 mmol/L β -磷酸甘油钠和 1%PS 的 L-DMEM 成

骨诱导液,于37℃、体积分数为5%的CO₂培养箱中继续培养,每隔3 d更换诱导液。诱导分化第14~21天吸去成骨诱导液,室温下体积分数为0.1的中性甲醛固定30 min,PBS清洗后加入pH=4的茜素红滴染3~5 min,显微镜下观察结果。

1.4.2 成脂诱导 常规消化传代,以 1×10^5 /孔的密度接种于6孔培养板中。待细胞达到完全融合后,加入含100 mL/L胎牛血清、10 μg/mL胰岛素、1%PS的H-DMEM成脂诱导液,于37℃、体积分数为5%的CO₂培养箱中继续培养,每隔3 d更换诱导液。诱导分化第14天吸去成脂诱导液,用PBS洗涤3次,体积分数为10%的中性甲醛室温固定1 h,PBS清洗后加入油红O染色30 min,蒸馏水冲洗,显微镜下观察结果。

2 结果

2.1 小鼠骨髓间质干细胞形态学

采用低密度培养,并结合克隆化培养分离技术,成功培养出C57BL/6小鼠的BMSCs。第1~5代细胞生长缓慢,约经历30~40 d时间,第6代开始细胞生长速度增快并且增殖速度稳定,一般1:2传代后3 d即可传代。此时通过有限稀释结合克隆挑选技术,最后获得三种不同形态的BMSC,我们将其称为MSC1、MSC2和MSC3。MSC1呈偏圆形(图1A、D),MSC2呈长梭形(图1B、E),MSC3呈纺锤形、多边形(图1C、F)。三种细胞均可长期传代培养。

2.2 小鼠骨髓间质干细胞免疫表型

选择CD45、CD11b、CD90.2、Sca-1四种表型标记检测MSC1、MSC2、MSC3的细胞表面标记表达情况。其中,三种细胞均强表达干细胞标记Sca-1,不表达造血系及内皮系标记CD11b、CD45,而三种细胞的CD90.2表达率分别为15.74%、85.05%、93.93%(图2)。

2.3 小鼠骨髓间质干细胞多向分化能力

检测三种表型MSC的体外成骨、成脂分化能力。其中,经成骨诱导液诱导2周后,发现MSC2有数目较多的散在的钙结节形成,采用茜素红染色呈红色结节状,中心颜色较深(图3B);而MSC1则未见有明显的钙结节形成,茜素红染色仅见数量稀少的红色小颗粒(图3A)。说明MSC2在体外具有成骨细胞分化的潜能;而MSC1则几乎没有

成骨分化潜能。

成脂诱导液诱导2周后,可见MSC1中有成簇脂肪细胞形成,高倍镜下可见胞质内有明显的脂滴,采用油红O染色呈强阳性(图3D);而MSC2在相同诱导条件下未见有脂滴形成(图3E)。说明MSC1在体外具有向脂肪细胞分化的潜能。

而MSC3在成骨诱导液和成脂诱导液诱导2周后,茜素红染色呈红色片状(图3C),油红O染色有明显的脂滴形成(图3F)。说明MSC3在体外具有成骨和成脂双向分化能力。

3 讨论

由于MSC具有多向分化和免疫调节功能,被认为在治疗多种疾病中是一种潜在的细胞治疗手段。目前,骨髓源性MSC可以从人、狒狒、猴、猫、狗、兔、大鼠、鸡、山羊、绵羊、猪等物种中成功分离^[5]。然而,由于小鼠骨髓MSC数量稀少以及巨噬细胞、内皮细胞、脂肪细胞甚至造血祖细胞等非MSC贴壁细胞长期存活,从而导致小鼠MSC的分离培养相对于人和其他物种来说存在更多困难。目前,小鼠骨髓MSC的分离培养有多种方法,如低密度及高密度培养法^[6]、免疫磁珠细胞分选法^[7],以及细胞毒物质暴露法^[8]、逆转录病毒转染筛选法^[9]、及有报道的频繁换液法(FMC)^[10]、纤维蛋白微珠(FMB)法^[11]等。Wang等^[12]在1990年采用全骨髓低密度培养法,将每500个细胞接种于一个35 mm培养板,结果在所有200个培养板中仅得到27个克隆。Mohamadreza等^[13]于2006年在此方法基础上对低密度培养法进行了改良,首先采用密度梯度离心法去除粒细胞、红细胞,取单个核细胞将每500个细胞接种于24孔板的一个孔中,结果每个24孔板平均可产生15~17个成纤维样克隆。该作者于2009年^[6]进一步对低密度培养法进行改良并与高密度培养法进行对比,原代全骨髓细胞以 2.5×10^6 cells/cm²接种于75 cm²培养瓶,待细胞铺满后分为50 cells/cm²的低密度培养和 10^5 cells/cm²的高密度培养,结果表明本文提出的低密度培养法相对高密度培养法,可以生成更为纯化的MSC。此外,也有报道采用免疫磁珠分选法(包括阴性^[7]和阳性^[14])分选小鼠骨髓MSC。但由于MSC缺乏特异性表型,采用系列相关抗体阴性或阳性分选到的MSC生物特性也受影响,如前者

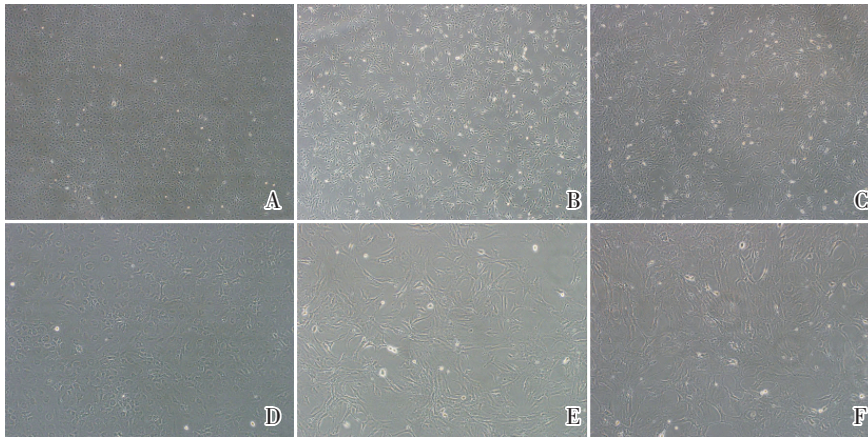


图 1 体外培养小鼠骨髓间质干细胞形态学

Fig.1 Morphology of cultured mouse bone marrow mesenchymal stem cells in vitro

A, D; MSC1 showed near round morphology at P10; B, E: MSC2 showed fibroblast-like morphology at P10; C, F; MSC3 showed fusiform and polygonal morphology at P10; A, B, C × 40; D, E, F × 100.

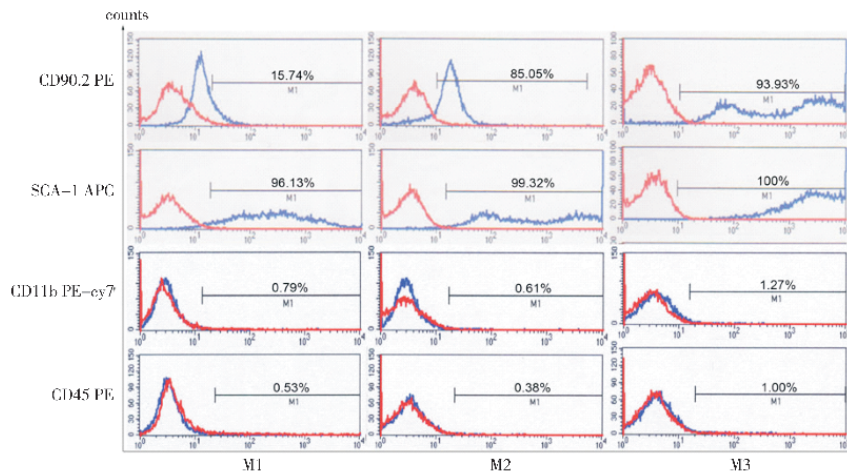


图 2 体外培养小鼠骨髓间质干细胞免疫表型

Fig.2 Immunophenotypic profile of cultured mouse bone marrow mesenchymal stem cells in vitro

M1: Immunophenotype of MSC1; M2: Immunophenotype of MSC2; M3: Immunophenotype of MSC3. Red plot lines: isotype control; Blue plot lines: stem cells.

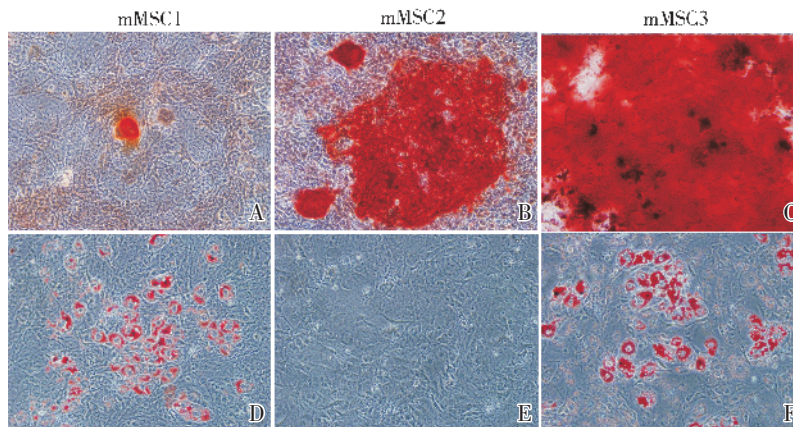


图 3 体外培养小鼠骨髓间质干细胞体外成骨和成脂分化能力

Fig.3 Osteogenic differentiation and adipocytic differentiation potential of cultured mouse bone marrow mesenchymal stem cells in vitro

A, B, C: osteogenic differentiation of MSC, Alizarin red staining, × 200; D, E, F: adipocytic differentiation of MSC, Oil red staining, × 200.

使分选到的 MSC 增殖力下降^[7],而后者 MSC 的分离则有种属特异性^[14]。因此目前比较多采用的还是低密度培养法。我们在研究中也主要采用此技术,并进行了适宜的改进,如采用红细胞裂解液替代密度梯度离心简便易行,原代细胞的频繁换液以尽可能去除杂细胞,并在传代中有限稀释获得了不同的克隆形成单位。

MSC 是一种高度异质性的细胞群,这主要是由于多潜能的间充质基质细胞可以向中胚层细胞系分化,从而使分离出的 MSC 中可能含有处于不同分化阶段的细胞类型,但是,有关 MSC 亚群与其特定生物学特性的研究非常有限。我们通过低密度培养并结合克隆化培养分离技术获得的三种表型细胞类型,可能是 MSC 中处于不同分化阶段的细胞亚群。

由于非 MSC 贴壁细胞的污染,传统方法培养的 mMSC 常表现出梭形、圆形、多边形形成的一个异质性群体。通过上述多种方法改良后,大部分文献报道的 mMSC 呈梭形。而我们采用低密度培养并结合克隆化培养分离技术得到了三种形态的 mMSC:MSC1 呈偏圆形(图 1A、D),MSC2 呈长梭形(图 1B、E),MSC3 呈纺锤形、多边形(图 1C、F)。其中 MSC1 和 MSC2 两种细胞随着培养代数增加至 P10 左右而区分开来,在传代过程中,MSC1 胰酶消化作用时间要长于 MSC2,而 MSC3 则基本维持其形态不变,三种细胞均可长期传代。三种细胞在成骨、成脂诱导体系中表现出不同的分化能力,其中 MSC1 仅向成脂分化,MSC2 仅向成骨分化,而 MSC3 则具有成骨成脂双向分化潜能。关于 MSCs 亚群的报告在 hMCS 中有见, Lee^[15]在其研究中通过增殖能力为 hMCS 建立了一个等级划分,包括高增殖潜能的间充质集落形成细胞(HPP-MCFC, 7%),低增殖潜能的间充质集落形成细胞(LPP-MCFC, 29%),间充质细胞簇(MCC, 26%),成熟间充质细胞(MMC, 38%),对这几种细胞进行多向分化诱导,发现 LPP-MCFC、MCC、MMC 具有成骨分化的潜能,但是不表现或极低效的向成脂分化,仅有 HPP-MCFC 表现出多向分化潜能。而我们的研究则同时发现了分别向成骨、成脂以及成骨和成脂多向分化的小鼠 MSC。Liu 等^[16]采用二氧化硅微珠得到了一种高成骨性的小鼠骨髓基质细胞亚群,该细胞体外具有三向分化潜能,而将该细胞进行皮下移植后发现矿化结节形成,那么我

们分离到的 MSC3 是否与此细胞类似仍需进一步通过体内试验证实。Post 等^[17]通过低密度培养从小鼠骨髓中分离得到了两种细胞亚群:仅向成骨分化的成骨前体细胞和仅向成脂分化的成脂前体细胞,其中成骨前体细胞呈梭形、成纤维样,成脂前体细胞呈圆形、卵圆形。从形态及分化能力来看,与我们这种方法获得的 MSC1 和 MSC2 两种细胞比较一致。可见我们获得的不同型别的 MSC 是处于多向分化或单一分化方向的不同分化阶段的细胞类型。

虽然已有多种技术方法对 mMSC 的分离培养进行改良,但是迄今为止,尚未有特异的 mMSC 表型标记可用于 mMSC 的纯化。不同方法获得的 mMSC 表型表达也有所差异,但是较为一致的结果是:CD44(透明质酸和骨桥蛋白受体)、SCA-1(造血干细胞及间充质干细胞标记)为阳性表达,CD11b(巨噬细胞和单核细胞标记)CD45(白细胞标记)为阴性表达,CD90.2 会有不同程度的表达。因此,我们选择 CD45、CD11b、CD90.2、Sca-1 四种表型标记对三种细胞表型进行比较。如图 2 所示,三种细胞均强表达干细胞标记 Sca-1,不表达造血系及内皮系标记 CD11b、CD45,这与多数文献报道的结果一致,可以从表型上进一步说明我们采取低密度培养及克隆化分离获得较为纯化的小鼠 MSC 是一种行之有效的分离培养方法。不同文献中 mMSC 表达 CD90.2 的报道有较大差异,有报道不表达和高表达,还有报道随着培养代数的增加表达增加。我们分离得到的相同代数的三种细胞其 CD90.2 表达率分别为 15.74%、85.05%、93.93%,则提示成脂前体细胞和成骨前体细胞以及较原始的 MSC3 其 CD90.2 表达率上的差异,这也可以解释不同文献中 mMSC CD90.2 表达不同可能是由于不同分离培养方法所获得的 mMSC 是包含不同分化类型及分化阶段的一种高度异质性的细胞群。

本文采用低密度培养并结合克隆化培养分离技术成功分离小鼠骨髓间充质干细胞并得到三种不同表型的 MSC。通过对三种表型 MSC 的对比结果,我们可以推断,不同文献报道中分离的 MSC 生物学特性差异极有可能是由于处于不同分化阶段的某一细胞亚群占优势而导致的结果。MSC1 占优势而混合有少量 MSC2,那么该细胞群就会表现出高成脂性和低成骨性,反之,MSC2 占优势而混

合有少量 MSC1, 则该细胞群就表现出高成骨性和低成脂性。这也可以为许多体外实验表现双向分化能力而体内分化实验仅表现出单向分化做出合理解释。三种表型细胞的共存也进一步提示了小鼠 MSC 是一种高度异质性的细胞群, 其中可能含有较原始的骨髓间充质干细胞、成骨前体细胞和成脂前体细胞等处于不同分化阶段的细胞类型。进一步探讨 MSC 的分离纯化及其生物学特性分析, 将对临床获得稳定有效的治疗效果有重要意义。

参考文献:

- [1] Satija NK, Singh VK, Verma YK, et al. Mesenchymal stem cell-based therapy: a new paradigm in regenerative medicine [J]. *J Cell Mol Med*, 2009, 13 (11-12): 4385-4402.
- [2] Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells [J]. *Lancet*, 2004, 363(9419): 1439-1441.
- [3] Larghero J, Vija L, Lecourt S, et al. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: toward new immunosuppressive strategies for the treatment of autoimmune diseases [J]. *Rev Med Interne*, 2009, 30 (3): 287-299.
- [4] Sudres M, Norol F, Trenado A, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro but fail to prevent graft-versus-host disease in mice [J]. *J Immunol*, 2006, 176 (12): 7761-7767.
- [5] Soleimani M, Nadri S. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow [J]. *Nat Protoc*, 2009, 4(1): 102-106.
- [6] Eslaminejad MB, Nadri S. Murine mesenchymal stem cell isolated and expanded in low and high density culture system; surface antigen expression and osteogenic culture mineralization [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2009, 45(8): 451-459.
- [7] Baddoo M, Hill K, Wilkinson R, et al. Characterization of Mesenchymal Stem Cells Isolated From Murine Bone Marrow by Negative Selection [J]. *J Cell Biochem*, 2003, 89(6): 1235-1249.
- [8] Modderman WE, Vrijheid-Lammers T, Lwik CW, et al. Removal of hematopoietic cells and macrophages from mouse bone marrow cultures: isolation of fibroblastlike stromal cells [J]. *Exp Hematol*, 1994, 22 (2): 194-201.
- [9] Kitano Y, Radu A, Shaaban A, et al. Selection, enrichment, and culture expansion of murine mesenchymal progenitor cells by retroviral transduction of cycling adherent bone marrow cells [J]. *Exp Hematol*, 2000, 28(12): 1460-1469.
- [10] Nadri S, Soleimani M, Hosseni RH, et al. An efficient method for isolation of murine bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *Int J Dev Biol*, 2007, 51(8): 723-729.
- [11] Rivkin R, Ben-Ari A, Kassis I, et al. High-yield isolation, expansion, and differentiation of murine bone marrow-derived mesenchymal stem cells using fibrin microbeads (FMB) [J]. *Cloning Stem Cells*, 2007, 9 (2): 157-175.
- [12] Wang QR, Wolf NS. Dissecting the hematopoietic microenvironment. VIII. Clonal isolation and identification of cell types in murine CFU-F colonies by limiting dilution [J]. *Exp Hematol*, 1990, 18(4): 355-359.
- [13] Eslaminejad MB, Nikmahzar A, Taghiyar L, et al. Murine mesenchymal stem cells isolated by low density primary culture system [J]. *Develop. Growth Differ*, 2006, 48(6): 361-370.
- [14] Nadri S, Soleimani M. Isolation murine mesenchymal stem cells by positive selection [J]. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Animal*, 2007, 43(4): 276-282.
- [15] Lee CC, Christensen JE, Yoder MC, et al. Clonal analysis and hierarchy of human bone marrow mesenchymal stem and progenitor cells [J]. *Exp Hematol*, 2010, 38(1): 46-54.
- [16] Liu H, Toh WS, Lu K, et al. A subpopulation of mesenchymal stromal cells with high osteogenic potential [J]. *J Cell Mol Med*, 2009, 13(8B): 2436-2447.
- [17] Post S, Abdallah BM, Bentzon JF, et al. Demonstration of the presence of independent pre-osteoblastic and pre-adipocytic cell populations in bone marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. *Bone*, 2008, 43(1): 32-39.

(编辑 孙慧兰)