

[文章编号] 1000-4718(2009)03-0519-06

绿色荧光蛋白标记的骨髓间充质干细胞在脑缺血大鼠体内迁移的实验研究*

王 晔¹, 邓宇斌^{1△}, 李 燕², 叶伟标¹, 叶美红¹(中山大学中山医学院¹病理生理教研室,²组织形态学研究中心, 广东 广州 510080)

[摘要] 目的: 探讨基质细胞衍生因子-1 α (SDF-1 α)对骨髓间充质干细胞(BMSCs)在SD大鼠脑缺血后迁移至脑损伤区的影响。方法: 构建大脑中动脉阻塞的脑缺血模型; 50只大鼠随机分为脑缺血PBS对照组、脑缺血MSCs治疗组。将腺病毒携带的增强型绿色荧光蛋白(EGFP)标记的MSCs, 在脑缺血1d后经尾静脉注射入大鼠体内; 用实时定量PCR检测缺血半暗带区基质细胞衍生因子-1 α (SDF-1 α)的分泌; 用流式细胞仪检测骨髓间充质干细胞上CXCR4的表达率; 用荧光共聚焦显微镜扫描显示骨髓间充质干细胞的迁移。结果: GFP转染率大约87%转染骨髓间充质干细胞; 实时定量PCR显示大鼠海马分泌的SDF-1 α 在1d时达到峰值, 1-14d一直维持在较高的水平, 14d后开始缓慢下降, 而皮质分泌的SDF-1 α 在第3d开始缓慢上升, 14d才达到峰值; 流式细胞仪检测BMSCs表面的CXCR4有14%; GFP标记的BMSCs移植后6h发现聚集在大脑中动脉起始处(嗅球), 在第3d后在丘脑等缺血半暗带区, 在14d后皮质处的GFP⁺BMSCs已有明显的增加。结论: 损伤组织SDF-1 α 浓度的升高与骨髓间充质干细胞迁移的增加可能存在一定的关系。

[关键词] 骨髓间质干细胞; 基质细胞衍生因子-1 α ; CXC趋化因子受体4; 脑缺血

[中图分类号] R363 **[文献标识码]** A

Migration of enhanced green fluorescent protein labeled bone marrow after transplantation into rat cerebral infarct

WANG Ye¹, DENG Yu-bin¹, LI Yan², YE Wei-biao¹, YE Mei-hong¹

(¹Department of Pathophysiology, ²Histomorphology Research Center, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China. E-mail: dengyub@mail.sysu.edu.cn)

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate the role of SDF-1 α in migrating of bone marrow stromal cells to the injured areas. **METHODS:** Ischemic brain lesion model was created in rats by permanent middle cerebral artery occlusion (MCAO). 48 SD rats were divided randomly into 2 groups. Group 1: phosphate buffered saline (PBS 1 mL) for control ($n=25$); Group 2: BMSCs (2×10^6) were injected intravenously at 24 h after MCAO ($n=24$). After propagated in BMSCs, Ad5/F35 GFP (green fluorescent protein) was infected to BMSCs. The expression of SDF-1 α (stromal cell-derived factor-1 α) mRNA in the penumbra tissue was assayed by real-time quantitative PCR. The expression of CXCR4 on MSCs was detected by flow cytometry. Confocal microscopy was used to detect the GFP-labeled MSCs migration. **RESULTS:** Ad5/F35 GFP signals was observed in almost infected BMSCs. The expressions of SDF-1 α mRNA in the thalamus and hippocampus of the ischemic brains were peaked at 3rd day after stroke, followed by a decrease at 14th day post-ischemia. The expression of SDF-1 α mRNA in the cortex of the ischemic brains was peaked at 7th day post-ischemia, still at high level at 14th day post-ischemia. The median percentage of surface CXCR4 expression in BMSCs was 14%. GFP labeled BMSCs were detected in the origination of the middle cerebral artery (olfactory area) at 6 h, after 3 days in the penumbra tissue such as thalamus, and in the cortex more labeled cells were found after 14 d post-ischemia. **CONCLUSION:** BMSCs can pass through the blood brain barrier of ischemic rats. Its mechanism might be associated with the expression of SDF-1 α in the ischemic brain.

[KEY WORDS] Bone marrow stromal cells; Stromal cell-derived factor-1 α ; CXC chemokine receptor 4; Brain ischemia

[收稿日期] 2008-03-31 [修回日期] 2008-10-08

*[基金项目]国家自然科学基金资助项目(No. 30271327);广东省科技计划重大资助项目(No. 2003A3020106; No. 2004A30201002);中山大学实验室开放基金资助项目(No. KF200721)

△通讯作者 Tel: 020-87331621; E-mail: dengyub@mail.sysu.edu.cn

骨髓间充质干细胞(bone marrow - derived stromal cells, BMSCs)相比其它干细胞具有低免疫源性、体外培养简单、不涉及伦理道德等特性,是组织工程的种子细胞^[1],近年来研究表明 BMSCs 具有向损伤处迁移并参与相应组织修复的能力^[2,3]。是何种因子在促进 BMSCs 迁移过程中起主要作用,他们的表达规律如何,又是通过什么机制发挥其作用的?目前这些因子对 BMSCs 迁移的研究主要集中在脑损伤和心肌损伤方面。迁移因子基质细胞衍生因子(stromal cell - derived factor - 1 α , SDF - 1 α)/CXC 趋化因子受体 4 (CXC chemokine receptor 4) 因其独特的一一对应性受到研究者极大的重视,尤其是在肿瘤细胞迁移的研究中。但对于在神经系统损伤后是否也能通过 SDF - 1 α 的分泌介导 BMSCs 的迁移研究,国内外还没有明确的报道。本研究通过观察脑缺血后脑组织中分泌 SDF - 1 α 的表达及其与 BMSCs 迁移的关系,探讨 SDF - 1 α 参与 BMSCs 迁移的具体作用。

材 料 和 方 法

1 材料

1.1 动物及分组 健康的 SD 大鼠,雄性(购自中山大学实验动物中心),3 月龄,体重 200 - 220g,清洁级。随机分 2 组:脑缺血 BMSCs 治疗组(BMSCs 组, 2×10^9 cells/L PBS),脑缺血 PBS 对照组(PBS 组, 1 mL)。每组各 25 只。

1.2 引物设计与合成 根据 SDF - 1 α 基因 cDNA 序列、CXCR4 基因 cDNA 序列和 β - actin 基因 cDNA 序列,合成引物。SDF - 1 α 引物 A: 5' - GCTCTGCATCAGTGACGGTA - 3'; 引物 B: 5' - TAATTTCCGGTCAATGCACA - 3'。 β - actin 引物 A: 5' - TGTCACCAACTGGGACGATA - 3'; 引物 B: 5' - GGGGTGTTGAAGTCT - 3'。CXCR4 引物 A: 5' - TGTCACCAACTGGGACGATA - 3'; 引物 B: 5' - GGGGTGTTGAAGTCT - 3'。3 对引物均由上海瑞真生物技术有限公司合成。

1.3 主要试剂 实时 PCR 试剂盒购于 Toyobo; Ad5/F35 GFP 购于本元正阳有限公司。DMEM/F12 培养基购于 Gibco - BRL,按说明书配制,4 $^{\circ}$ C 保存;特级胎牛血清购于以色列 Kibbutz beit haemek,分装 - 20 $^{\circ}$ C 保存。CD11b、CD29、CD343、CD45 单抗购于 BD; 抗 GFP 抗体购于 MBI Fermentas; 抗 CXCR4 抗体购于武汉博士德生物工程公司;兔抗 FITC 单抗购于 Chemicon。

2 方法

2.1 细胞培养 本实验根据细胞贴壁的特性分离

纯化 MSCs。清洁级 SD 大鼠(60 - 80g),脱臼处死,无菌条件下取双侧股骨,冲出骨髓腔中的骨髓细胞,用含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液常规培养在 37 $^{\circ}$ C、饱和湿度、5% CO₂ 的培养箱中。按常规方法传代。待细胞传至第 4 至 6 代时用于实验。缺氧实验中,取体外培养的 P5 - 6 代的 BMSCs 生长至 80% - 90% 融合后,置于 2% O₂、93% N₂ 和 5% CO₂ 的缺氧盒中 48h 造成 BMSCs 缺氧。用含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液制备腺病毒载体(Ad5/F35)携带的增强型绿色荧光蛋白(enhance green fluorescent protein, EGFP) 转染液,感染复数为 100,转染前吸出 MSCs 原培养液,PBS 洗 2 遍,加入转染液放入培养箱中培养 6 h,加等量的全培养液,24 h 后在倒置荧光显微镜下观察 GFP 表达情况。

2.2 动物模型复制 大鼠全麻后,仰卧固定于手术台上,取颈部右侧旁正中切口,剪开浅筋膜,分离二腹肌、胸锁乳突肌和肩胛舌骨肌之间的肌间隙,暴露右侧的颈总动脉和迷走神经,再逐步依次分离暴露颈总动脉分叉部、颈外动脉、颈内动脉。分离颈内动脉至近颅底,并找出颈内动脉颅外段的唯一分支翼腭动脉。在颈内动脉、颈外动脉和颈内动脉处预留 5 - 0 丝线做牵拉、结扎用。在颈总动脉剪开切口,由断端沿着颈内动脉送入渔线,插入长度为 17 - 20 mm(从颈总动脉分叉处计算),微遇阻力时即停止。手术完毕后让大鼠自然清醒。

2.3 组织总 RNA 的提取、逆转录合成 cDNA 首链 分别随机从两组老鼠中麻醉处死 5 只,立即取脑组织分离出缺血侧海马和皮质,匀浆,参照总 RNA 提取试剂盒说明书进行。取总 RNA 2 μ L,加随机引物 1 μ L,70 $^{\circ}$ C 水浴变性 5 min,置冰浴中冷却后,再加 5 \times 缓冲液 4 μ L,10 mmol/L 三磷酸脱氧核苷(dNTPs)2 μ L,M - MLV 反转录酶 1 μ L,于 42 $^{\circ}$ C 反应 1 h,70 $^{\circ}$ C 终止反应,置冰浴中冷却。

2.4 荧光定量 RT - PCR 和普通 RT - PCR 取逆转录产物 5 μ L,加 dNTP 至 200 μ mol/L,按荧光 PCR 试剂盒要求完成实验步骤,标准曲线设置 10 个梯度,每个梯度 10 倍倍比稀释,同时设置不加模板的阴性对照孔。最后给出的模板量是相对量,进行量的比较时直接与同一模板的相对量 β - actin 进行相除后再比对即可,即: ratio = (样本 1 中 SDF - 1 相对量/样本 1 中 β - actin 相对量)/(样本 2 中 SDF - 1 相对量/样本 2 中 β - actin 相对量)。普通 RT - PCR 取 8 μ L cDNA 用于 PCR 扩增,将反应体系加热至 95 $^{\circ}$ C,2 min 后,模板完全变性,然后扩增 32 循环,每个循环包括 95 $^{\circ}$ C 1 min,56 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 2 min。用 1.2%

琼脂糖凝胶电泳检测。实验重复3次。

2.5 流式细胞仪检测 CXCR4 的表达率 取第4至第6代的 BMSCs,用胰酶消化后制成单细胞悬液,用 PBS 洗2次,取 1×10^6 细胞加入兔抗大鼠 CXCR4 抗体,常温下,避光孵育 30 min, PBS 洗1次,再加抗兔 IgG 的 FITC,同样避光孵育 30 min, PBS 洗去荧光抗体,1%多聚甲醛固定后,用流式细胞仪(Epics Altra)检测,并用 Expo32Analysis 软件分析结果。

2.6 免疫组化 在大鼠脑缺血后 7 d,水合氯醛过量处死后立即取大鼠脑冠状组织块(距前囟 ± 0.2 mm),采用冰冻切片连续切片。用冰丙酮固定 15 min 后, PBS 洗去,直接用 10% BSA 室温下封闭 30 min 后,加小鼠抗 GFP(1:400)孵育 30 min,接着加抗小鼠 FITC-conjugated IgG,避光孵育 30 min,最后直接在激光共聚焦成像仪下拍照。

3 统计学处理

采用 SPSS 11.0 软件分析。数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用方差分析进行统计学处理。

结 果

1 BMSCs 的形态学检测

流式细胞仪分析结果显示, BMSCs 经过反复传代的方法获得均一的细胞,表型为 CD29 阳性,而 CD45、CD11b、CD34 为阴性。倒置显微镜下即可观察到细胞大量呈漩涡状生长,形态多呈扁平状梭形和纺锤形等多型性。因此, BMSCs 可以通过细胞的表面标志结合细胞形态进行初步鉴定。用 Ad5/F35 腺病毒转染 6 h 后,细胞呈现多角形,伸出触角,在恢复血清培养 24 h 后,与正常培养的细胞在形态上无明显差异,见图 1。

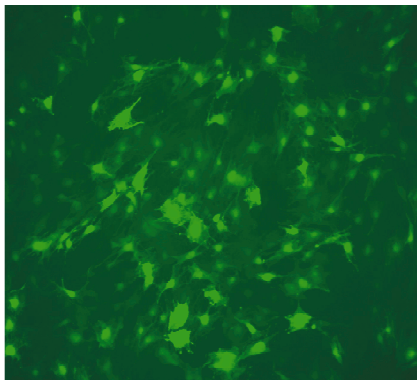


Fig 1 MSCs (passage 5) were incubated with an adenovirus vector that expresses EGFP (Ad5/F35eGFP) under CMV promoter for 6 h. The multiplicity of infection (MOI) was 100 (green, $\times 200$).

图1 腺病毒携带 GFP 高效率转染骨髓间充质干细胞

2 病毒转染率

Ad5/F35 腺病毒转染第4代 BMSCs 6 h 后细胞呈多角形,加入等量全培养液培养 24 h 后换液,在荧光倒置显微镜下观察,可见细胞恢复梭形,形态饱满可见绿色荧光,荧光细胞占总细胞的比例约为 87% ($P < 0.05, n = 5$)。

3 定量缺血脑组织 SDF-1 分泌

荧光定量 RT-PCR 检测发现,在脑缺血 1d 后缺血侧海马 SDF-1 的分泌量明显升高且一直维持在很高的水平上,直到 14d 才略为下降 ($P < 0.05, n = 5$),见图 2A,而缺血侧皮质 SDF-1 的分泌量在脑缺血 1d 后开始缓慢升高,但在 14d 达到最高值 ($P < 0.05, n = 5$),见图 2B。

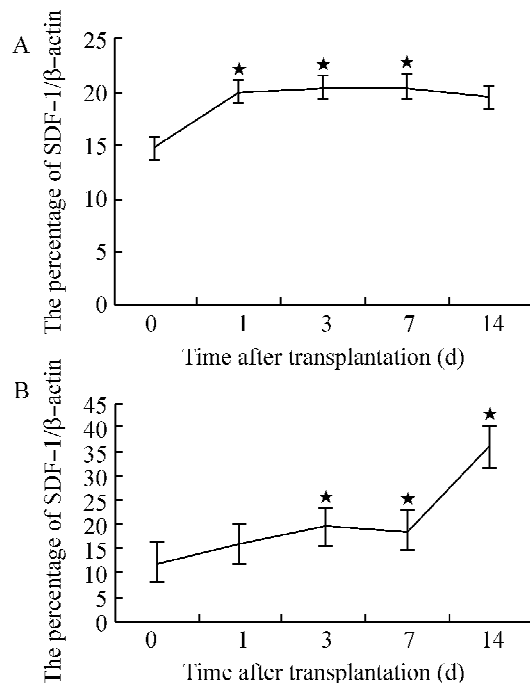


Fig 2 SDF-1 α mRNA levels in the ischemic hemisphere of MCAO rats were quantified using real time quantitative PCR after transplantation 1, 3, 7 and 14 d. A: in hippocampus; B: in cortex. $\bar{x} \pm s, n = 5, *P < 0.05$ vs control group (0).

图2 荧光定量 PCR 法分析缺血侧海马和皮质分泌 SDF-1 α

4 BMSCs 上 CXCR4 的表达率

BMSCs 的 CXCR4 受体的表达分别在 mRNA 和蛋白水平用 RT-PCR 和流式细胞仪分析。RT-PCR 显示正常培养的 BMSCs 表面 CXCR4 表达很弱,缺氧条件下培养的 BMSCs 在细胞数目没有差异的条件下 CXCR4 的表达明显增强;且用间接荧光染色法检测 CXCR4 阳性细胞的比例。分析结果显示,第5代 BMSCs 上 CXCR4 的表达率达到 $7.13\% \pm 1.67\%$ ($n = 5, P < 0.05$),见图 3。

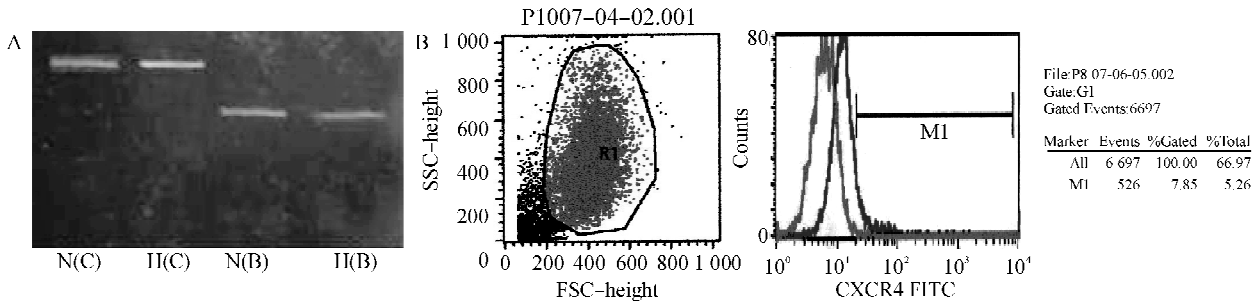


Fig 3 CXCR4 expression on the BMSCs. A: RT-PCR expression of CXCR4 mRNA in the normal (N) and hypoxia (H) cultured - MSCs. The product for the β - actin housekeeping gene is shown as an internal control for mRNA. B: surface expression of CXCR4 on BMSCs detected by flow cytometry. Histograms represent surface expression of CXCR4 on passage 5 of BMSCs. The red line of the histogram indicates cells stained with antichemokine receptor antibodies, the black line indicates staining with the isotype control. The numbers represent the percentage of cells positive for a given chemokine receptor, where the threshold line for positive cells was based on maximum staining by a matching isotype with irrelevant specificity, used in the same concentration as the antichemokine receptor antibody.

图3 RT-PCR(A)和流式细胞仪(B)检测骨髓间充质干细胞表面CXCR4的表达

5 移植的BMSCs在缺血脑中的分布

在脑缺血1d后经大鼠尾静脉移植Ad5/F35GFP⁺BMSCs,用激光共聚焦扫描成像仪观察显示绿色荧光的BMSCs通过损伤的血脑屏障在缺血脑中的分布现象(图4)。在移植6h观察发现绿色荧光主要聚集在大脑中动脉起始处(嗅球),也就是血管损伤的始端;在第3d后发现绿色荧光开始在海马、丘脑和下丘脑等处分布;在14d时皮质处的绿色荧

光已有明显的增加,主要分布在运动皮质等处。而且我们观察发现GFP⁺BMSCs只分布在缺血侧半球,在对侧半球几乎不能观察到绿色荧光。在缺血中心区也几乎不能观察到绿色荧光,荧光主要分布在缺血半暗带区,如示意图4所示,灰色区域表示缺血半暗带区,黑色区域表示缺血汇中心区,白色区域表示未损伤组织。

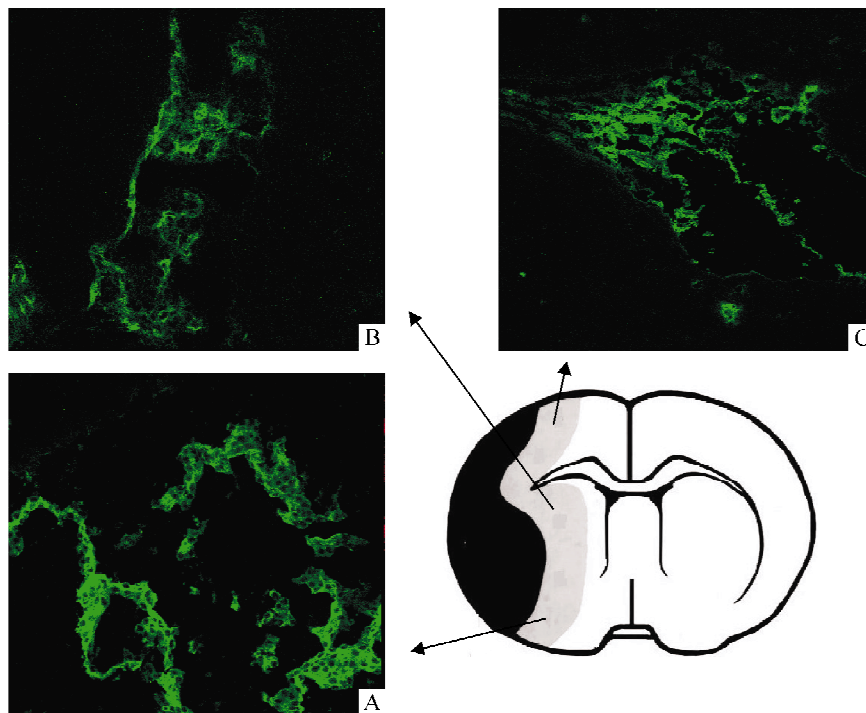


Fig 4 Panels show migration of GFP⁺ BMSCs in the ischemic cerebral at different time points following MCAO (magnification, $\times 100$). A: At 6 h after transplantation, majority of GFP⁺ cells confined to olfactory area; B: At 3 d after transplantation, abundant GFP⁺ BMSCs are detected in the penumbral area, which mainly includes thalamus and hippocampus; C: GFP⁺ BMSCs extend across the motor cortex at 14 d after transplantation.

图4 在激光共聚焦扫描成像仪下观察GFP标记的BMSCs在脑缺血1d后静脉移植入脑内的分布情况

讨 论

骨髓间充质干细胞(BMSCs)是一类存在于骨髓网状间质内的非造血干细胞,具有分化成各种间叶组织细胞的潜能,在一定条件下可自我复制并能分化成多种细胞,其中包括神经细胞和神经胶质细胞^[4]。

我们前期研究发现体外培养的 BMSCs 和移植入体内的 BMSCs 都能分泌多种神经营养因子,如血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)、神经生长因子(nerve growth factor, NGF)等,这些神经营养因子对损伤的神经细胞修复能产生促进作用。我们还发现 BMSCs 能减少缺血组织的凋亡、促进内源性神经干细胞增生,进而通过加强内源性的脑修复系统的效能改善神经功能,从而治疗脑缺血等神经退行性疾病^[5,6],其他研究者的报道也与我们的研究基本吻合^[7,8]。

基质衍生因子(stroma-derived factor-1, SDF-1)是 CXC 类趋化蛋白,是已知唯一能与受体 CXCR4 结合并能启动它的天然趋化因子。SDF-1/CXCR4 被认为是在很多系统损伤时能直接使干细胞迁移进行修复的重要的调控轴,涉及神经生长、神经母细胞迁移、神经元构建和血管生成等方面,在中枢神经系统发生、神经损伤修复中起关键的作用。SDF-1 α 主要由中枢神经系统的神经元、星形胶质细胞和小胶质细胞以及血管上皮细胞分泌^[9,10],最近研究表明 CXCR4 高表达在很多干细胞表面^[11]。CXCR4⁺ 细胞可以跟随 SDF-1 的浓度梯度,不仅能动员内源性的 CXCR4⁺ 细胞还能将外源性的骨髓来源的细胞吸引迁移至脑损伤部位^[12,13]。

本研究在 mRNA 水平上检测了缺血脑组织分泌 SDF-1 α ,实时定量 PCR 结果分析,SDF-1 α 在损伤后呈现一定的时空差异性,BMSCs 移植组海马分泌 SDF-1 α 在脑缺血损伤 1-3 d 后即达高峰,而皮质分泌的 SDF-1 α 在损伤 14 d 时达高峰,这一结果首先表明了 BMSCs 是先到达海马再至皮质的迁移过程;其次也证明了静脉移植的 BMSCs 能促进缺血组织分泌 SDF-1 α 。Hill 等^[9]通过免疫组化和原位杂交的方法发现,SDF-1 α 在缺血半暗带区表达明显增加,在血管丰富的组织 SDF-1 α 的分泌在缺血后 14 d 达高峰并持续至 30 d,且他们还发现移植的 BMSCs 只分布在缺血损伤半球侧,在对侧半球几乎

没有发现,这与本研究的结论是一致的。本研究进一步分别用 RT-PCR 和流式细胞仪在 mRNA 和蛋白水平分析了 BMSCs 表面 CXCR4 的表达,结果发现正常培养的 BMSCs 能表达一定水平的 CXCR4,在受到一定刺激后,例如缺氧条件培养时 BMSCs 表面 CXCR4 表达增高。近年来很多研究者^[14,15]发现骨髓来源的细胞表面表达一定量的 CXCR4,但在细胞里 CXCR4 的表达却高达 90% 以上,他们推测细胞在受到一定刺激时 CXCR4 才会以有活性的方式表达在细胞表面,以增加损伤后细胞向着 SDF-1 浓度梯度的方向运动的能力。之后本实验用激光共聚焦断层扫描成像仪显示 GFP 转染的 BMSCs 在脑缺血大鼠静脉移植后,穿过损伤的血脑屏障进入缺血脑组织,并随着时间的推移分布在缺血脑内的不同组织部位,且主要分布在缺血半暗带,这也证实了 BMSCs 的存活也需要微环境的支持营养作用,缺血中心区细胞死亡且炎性细胞分泌很多酶和酸性物质不适合 BMSCs 的存活,而缺血半暗带可能恰好提供了 BMSCs 存活的微环境。ChoPP 研究小组和其他很多研究者^[2,5,6,16]也都证实了我们的发现,BMSCs 能通过损伤的血脑屏障并分布在缺血半暗带区,但尚没有明确的报道阐明 BMSCs 的这种损伤“趋向性”的分子机制。Ji 等^[17]检测了 BMSCs 在左舌下神经损伤的老鼠模型迁移过程中 SDF-1 α 和 CXCR4 所起的作用。发现植入侧脑室的 BMSCs 能够定向迁移至损伤的舌下神经核,舌下神经核在损伤后表达 SDF-1 α 增加,手术后的第 1 周和第 2 周,SDF-1 α 表达和 BMSCs 迁移至损伤区的数量相平行。本研究发现,BMSCs 这种时空分布的特性与缺血脑组织分泌 SDF-1 α 的时空特点基本一致,正好可以解释 BMSCs 在缺血脑内的迁移现象,也为 BMSCs 治疗脑缺血等中枢神经损伤性疾病的机制研究提供了可靠的实验数据。

与神经干细胞移植相比,采用 BMSCs 进行移植治疗,其资源丰富,可来源于自体,无组织异源性,无伦理限制,能穿过血脑屏障并向大脑组织迁移与脑组织整合,易于临床广泛应用,发展潜力巨大。本研究为 SDF-1/CXCR4 参与了 BMSCs 向损伤处迁移提供了充分的实验数据,这为临床应用静脉注射 BMSCs 治疗神经损伤性疾病提供了可能。

[参 考 文 献]

- [1] Chopp M, Li Y. Treatment of neural injury with marrow

- stromal cells [J]. *Lancet Neurol*, 2002, 1(2): 92 - 100.
- [2] Chen J, Zhang ZG, Li Y, et al. Intravenous administration of human bone marrow stromal cells induces angiogenesis in the ischemic boundary zone after stroke in rats [J]. *Circ Res*, 2003, 92 (6): 692 - 699
- [3] Shyu WC, Lee YJ, Liu DD, et al. Homing genes, cell therapy and stroke [J]. *Front Biosci*, 2006, 11(1): 899 - 907.
- [4] 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.
- [5] 王颖, 邓宇斌, 王晔, 等. 骨髓间质干细胞诱导为神经元样细胞移植治疗脑梗塞模型大鼠后运动功能的改善 [J]. *中国病理生理杂志*, 2006, 22(12): 2401 - 2406
- [6] 胡贞贞, 邓宇斌, 王晔, 等. 静脉移植骨髓基质干细胞对脑缺血大鼠神经功能及神经细胞凋亡的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2008, 24(6): 1084 - 1089.
- [7] Li Y, Chopp M, Chen J. et al. Intrastratial transplantation of bone marrow nonhematopoietic cells improves functional recovery after stroke in adult mice [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2000, 20(9): 1311 - 1319.
- [8] Chen J, Li Y, Katakowski M, et al. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats [J]. *J Neurosci Res*, 2003, 73 (6): 778 - 786.
- [9] Hill WD, Hess DC, Martin - Studdard A, et al. SDF - 1 (CXCL12) is upregulated in the ischemic penumbra following stroke: Association with bone marrow cell homing to injury [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2004, 63(1): 84 - 96.
- [10] Shen LH, Li Y, Chen J, et al. Therapeutic benefit of bone marrow stromal cells administered 1 month after stroke [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2007, 27(1): 6 - 13.
- [11] Ponte AL, Marais E, Gally N. et al. The *in vitro* migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: Comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities [J]. *Stem Cells*, 2007, 25(7): 1737 - 1745.
- [12] Mill JT, Bartley JH, Wimborne HJ, et al. The neuroblast and angioblast chemotactic factor SDF - 1 (CXCL12) expression is briefly up regulated by reactive astrocytes in brain following neonatal hypoxic - ischemic injury [J]. *BMC Neurosci*, 2005, 31(6): 63.
- [13] Bhakta S, Hong P, Koc O. The surface adhesion molecule CXCR4 stimulates mesenchymal stem cell migration to stromal cell - derived factor - 1 *in vitro* but does not decrease apoptosis under serum deprivation [J]. *Cardiovasc Revasc Med*, 2006, 7(1): 19 - 24.
- [14] Otsuru S, Tamai K, Yamazaki T, et al. Circulating bone marrow - derived osteoblast progenitor cells are recruited to the bone - forming site by the CXCR4/stromal cell - derived factor - 1 pathway [J]. *Stem Cells*, 2008, 26(1): 223 - 234.
- [15] Shichinohe H, Kuroda S, Yano S, et al. Role of SDF - 1/CXCR4 system in survival and migration of bone marrow stromal cells after transplantation into mice cerebral infarct [J]. *Brain Res*. 2007, 1183 (5): 138 - 147.
- [16] Horita Y, Honmou O, Harada K, et al. Intravenous administration of glial cell line - derived neurotrophic factor gene - modified human mesenchymal stem cells protects against injury in a cerebral ischemia model in the adult rat [J]. *J Neurosci Res*, 2006, 84(7): 1495 - 1504.
- [17] Ji JF, He BP, Dheen ST, et al. Interactions of chemokines and chemokine receptors mediate the migration of mesenchymal stem cells to the impaired site in the brain after hypoglossal nerve injury [J]. *Stem Cells*, 2004, 22(3): 415 - 427.