

骨内注射骨内膜细胞和其他注射骨髓细胞方法诱导同种异体皮片存活比较

陈晨 陈建武 苏映军 杨阳 郭树忠

【摘要】目的 比较骨内注射骨内膜骨髓细胞(EBMCs)和注射中央冲出骨髓细胞(CBMCs)(骨内注射或者静脉注射两种方法)对诱导同种异体皮片存活时间的差异,比较细胞移植前后CMBC及EBMC的表达的变化及两者的差异。**方法** 通过联合低剂量的照射(4.8 Gy)、早期使用雷帕霉素(Rapa)预处理受体小鼠(C57BL/6)后,以骨内注射或者静脉注射的方法输注供体来源(Balb/c)的不同组群(EBMCs或者CBMCs)的细胞,4周后给予受体异体全厚皮片移植,并观察皮片存活情况,绘制皮片存活曲线;从移植前后不同的细胞组群(EBMCs或者CBMCs)中提取mRNA,利用荧光定量PCR技术,比较与造血干细胞迁移(CXCL-12等)和免疫调节相关的基因(Foxp3,IL-10,TGF- β 等)在mRNA水平的相对表达量的差异。**结果** 骨内注射EBMCs平均存活21.5 d,较静脉注射和骨内注射CBMCs(分别平均存活18 d和15 d)可以更好地诱导同种异体皮片的存活;荧光定量PCR显示未处理小鼠骨髓中EBMC较CBMC中CXCL-12及调节性T细胞相关因子(IL-10,Foxp3等)明显升高;经过放射及骨内注射预处理4周后,CBMC和EBMC的IL-10表达较预处理前均升高,CBMC中Foxp3表达增高,EBMC中CXCL-12、Foxp3及N-cadherin表达均降低。**结论** 骨内注射EBMCs可以较骨内注射及静脉注射CBMCs更好地诱导免疫耐受的形成。

【关键词】 免疫耐受; 骨髓移植; 造血干细胞

Compare the inducing capacity of endosteal and central bone marrow cells for immune tolerance against allogeneic skin grafts CHEN Chen, CHEN Jian-wu, SU Ying-jun, YANG Yang, GUO Shu-zhong. Institute of Plastic Surgery, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China
Corresponding author: GUO Shu-zhong, Email: shuzhong@fmmu.edu.cn

【Abstract】 Objective It is intended to investigate the respective roles of central and endosteal bone marrow cells in immune tolerance induction for allogeneic skin graft, the profiles of mRNA expression of the two cell populations are compared before and after transplantation, to give an insight into their possible roles in the bone marrow cells transplantation. **Methods** Precondition the recipient mice with low dosage of X-ray irradiation (4.8 Gy) and Rapamycin ($2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1} \times 7 \text{ d}$) combined with the injection of 10 million donor-derived cells (either EBMCs or CBMCs), full-thickness skin transplantation is done until 4 weeks later, the texture and color of the skin transplants are observed for any immune rejection signs. Harvest cells of the two cell populations for whole RNA extraction, do quantitative PCR for homing (CXCL-12) and immune regulatory (Foxp3, IL-10, TGF- β etc.) genes for both CBMC and EBMC. **Results** The injection of endosteal bone marrow cells (average 21.5 days of survival) could further elongate the survival of donor-derived transplants than the injection of CBMCs (Intrabone transplantation: average survival period, 18 days, Intravenous Transplantation, average survival period, 15 days); IL-10, Foxp3, N-cadherin not TGF- β are highly expressed in EBMC before transplantation; 4 weeks after transplantation, the expression of IL-10 increase in both CBMC and EBMC cell populations, while the expression of CXCL-12, Foxp3, N-cadherin decrease in the EBMC. **Conclusion** Compared with injection of CBMCs both through intrabone and intravenous bone marrow transplantation, the intrabone infusion of endosteal bone marrow cells could induce longer allogeneic skin transplants survival.

【Key words】 Immune tolerance; Bone marrow transplantation; Hematopoietic stem cells

早在1978年 Schofield^[1]就提出了 Niche 的概念,即骨髓中存在一群分化潜能较高的细胞,而其生存环境 Niche 对于这群细胞的生存及功能起到了极为重要的作用。Lord 等^[2]发现骨髓中的细胞并不是均匀分布的,通过更大的压力冲出的细胞可以更好地在体外增殖。但是直到2003年,成骨母细胞(osteoblast,一种贴附于骨内膜表面的一种骨髓细胞)^[3-4]在骨髓微环境中的作用才逐渐被发现。Song 等^[5]证实,早期的血源性干细胞主要定植于骨内膜区域。Haylock 等^[6]利用酶消化的方法将这群细胞消化下来,比较了骨内膜骨髓细胞(endosteal bone marrow cells, EBMC)和冲出的中央骨髓细胞(central bone marrow cells, CBMC)在体外增殖、体内归巢及帮助造血干细胞(hematopoietic stem cell)诱导血源性系统的重建的能力方面,发现这群 EBMC 均较 CBMC 显示了优势。

2001年日本学者^[7]通过骨内注射将全骨髓细胞注射到基因缺陷的小鼠体内,纠正了血液系统缺陷性疾病。其他文献^[8-9]表明,骨内注射较静脉注射骨髓细胞联合放射等预处理方法可以更好地诱导同种异体心脏、肝脏的成活,更好地诱导免疫耐受,而对于皮片移植的研究却鲜有报道。注射骨髓细胞的同时注射胶原^[10]或使用磁珠标记细胞及外用磁铁保留注射的细胞^[11]的方法均可以提高照射后血液系统重建的成功率。

CXCL-12 是动物体内与细胞迁移功能相关的重要分子之一。Peled 等^[12]发现,人体的骨髓细胞经过 CXCR4 (CXCL-12 的配体) 抗体处理之后,定植于裸鼠体内的能力大大降低了;如果用 CXCL-12 的抗体去处理受体裸鼠,早期的干预可以同样使得供体细胞定植降低。调节性 T 细胞(regulatory T cells, Treg) 是人体及动物体内,降低局部组织的免疫攻击反应的重要细胞群,白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)、肿瘤生长因子- β (tumor growth factor-beta, TGF- β) 是其重要的调节因子。2011年日本学者 Fujisaki 等^[13]通过将 DiD 标记同种异体的造血干细胞注入 Treg-GFP 小鼠体内,不进行清髓治疗的情况下,骨髓干细胞主要定植于 Treg 15 μm 的范围之内,而 Treg 的这种调节性机制是由 IL-10 介导的,而不是 TGF- β 。与此同时, Renstrom 等^[14]证实,基因敲除分泌曲卷相关蛋白(secreted frizzled-related protein 1, Sfrp1) 的表达虽然不会使基因缺陷鼠的干细胞数量减少,但是会使移植进入基因缺陷鼠体内细胞的重建血液系统的能力下降。

所以,骨内膜区域可能是移植中血源性干细胞特异性迁移的特殊部位,这一区域中的细胞(如 Treg) 为造血干细胞提供了重要的保护作用。本实验则通过酶

消化的方法将这群骨内膜区域的细胞消化下来,并且联合骨内注射直接将供体来源的细胞输注到受体的骨髓腔中去,并观察其是否较静脉注射 CBMC 更有利于诱导同种异体皮片的免疫耐受和存活。同时利用荧光定量 PCR 技术,观察小鼠骨髓两种不同的细胞组群在移植前后细胞迁移分子和免疫调节分子变化的过程。

材料和方法

一、材料

C57bl/6 小鼠作为受体和 Balb/c 小鼠作为供体,均来自第四军医大学动物实验中心,6~8 周龄,雌性。小鼠均采用高压灭菌饲料和水进行饲养。经过照射小鼠,均给予酸水(HCl, pH 2.0) 饮水。

二、方法

1. CMBC 及 EBMC 的提取:将供体小鼠处死后,取出双侧股骨胫骨。剪去干骺端, PBS 冲出中央骨髓,即为 CBMC。将干骺端及剩余骨干用剪刀剪碎后,每4块骨头加入2 ml 酶溶液(3 mg/ml I 型胶原酶;2 mg/ml dispase), 350 r/min 轨道振荡器中 37 °C 震荡 10 min, 后 PBS 反复冲洗 2 次,即为 EBMCs。

2. 分组:A 组:照射 + 雷帕霉素处理组,不打入骨髓细胞,样本量 5 只;B 组:不进行任何处理的空白对照组,样本量 6 只;C 组:照射 + 雷帕霉素 + 骨内注射 EBMC 处理组,样本量 4 只;D 组:照射 + 雷帕霉素 + 骨内注射 CBMC 处理组,样本量 5 只;E 组:照射 + 雷帕霉素 + 静脉注射 CBMC 处理组,样本量 5 只。

3. 骨内注射及静脉注射:骨内注射根据 Kushida 等^[7]的方法进行,并且稍作改进:将小鼠麻醉后,胶布固定,剪去局部毛发及少量皮肤,用头皮针插入股骨,将微量注射针随后插入,可以打入 20~40 μl 的细胞悬液。

4. 皮片移植及观察:供体皮片来源于 Balb/c 小鼠的腹部全厚皮片,受区为 C57bl/6 小鼠左侧胸部,植皮局部创可贴固定,10 d 后打开包扎进行观察。皮片观察指标包括:皮片的颜色,质地,表面结痂情况。正常存活皮片表面颜色与周围一致,质地柔软,表面可结痂但打开包扎后数日可自动脱落。产生排斥皮片表现为:逐渐局部出现红斑,角质剥脱,皮片逐渐高于周围皮肤,最后结痂脱落。若红斑遍布皮片且皮片逐渐高于周围皮肤,该皮片视为已产生排斥反应。

5. 荧光定量 PCR:RNA 的提取:依据以上方法将不同组群的细胞提取出来之后,用 Trizol (Sigma) 处理,平均每 1×10^7 的细胞约加入 1 ml Trizol;根据试剂盒进行反转录,并将所得 cDNA 保存于 -20 °C。引物来自于海宁公司设计: N-cadherin-F: 5'-CAATGAT-

GGGCTAGTCACAGTGG-3'; N-cadherin-R: 5'-CGACT-GAGGTGGGTGCTGAA-3'; CXCL-12-F: 5'-CCCGAAAT-TAAAGTGGATCCAAGAG-3'; CXCL-12-R: 5'-GCCAGT-TACAAAGCGCCAGAG-3'; IL-10-F: 5'-GCCAGAGCCA-CATGCTCCTA-3'; IL-10-R: 5'-GATAAGGCTTGGCAAC-CCAAGTAA; TGF- β -1-F: 5'-GTGTGGAGCAACATGTG-GAACTCTA-3'; TGF- β -1-R: 5'-CGCTGAATCGAAAGC-CCTGTA-3'; GAPDH-F: 5'-TGTGTCCGTCGTGGATCT-GA-3'; GAPDH-R: 5'-TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG-3'; Sfrp 1 precursor-F: 5'-TACTGGCCCCGAGATGCTCAA-3'; Sfrp 1 precursor-R: 5'-AGAGATGTTCAATGATGGC-CTCTG-3'; Foxp3-F: 5'-AGTGCCTGTGTCTCAATGGTC-3'; Foxp3-R: 5'-AGGGCCAGCATAGGTGCAAG-3'。

荧光定量 PCR 均采用双 delta 法进行测量,数据分析利用 REST2009 软件进行分析。因为所得为倍数,不是正态分布的数据,在进行统计分析时,先将所得倍数取对数(\log_{10})处理,然后进行分析。SYBR 试剂盒: SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (Perfect Real Time) (200 次量, TaKaRa Code: DRR041A), 所有样品及反应液体的配置均按照试剂盒说明书进行。

6. 放射:放射均采用第四军医大学防原教研室 X 线机,4.8 Gy 照射,平均照射速率 1.05 cGy/min。

三、统计学分析

计量资料结果均表示为均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$), 所有数据都使用 PASW Statistics 18.0 软件分析,因荧光定量 PCR 结果为相对表达量,即为倍数,所以给予对数处理(底数均为 10), 各组之间的两两比较的方法为 SNK- q 检验, $P < 0.05$ 为两组间差异有统计学意义。在未注射骨髓细胞之前,同一小鼠骨髓中 EBMC 及 CBMC 中各基因的表达量相互比较,并进行统计学分析;在注射骨髓细胞之后,受体 EBMC 及 CBMC 与未进行骨髓注射的 EBMC 及 CBMC 分别进行比较,同时 EBMC 与 CBMC 进行比较,所得数据再与预处理之前数据比较,并进行统计学分析。

结 果

1. EBMC 的鉴定:依照以上所述方法,将骨髓细胞冲出得 CBMC,并将骨内膜细胞消化下来得 EBMC,进行荧光定量 PCR 检测。将两群细胞所得数据进行比较,结果如图 1 所示。可见骨内膜细胞较冲出骨髓细胞中的 CXCL-12(平均升高 7.05 倍), Foxp3(平均升高 6.45 倍), N-cadherin(平均升高 0.93 倍), IL-10(平均升高 4.25 倍)等都有明显的升高,而 TGF- β 表达量较中央冲出骨髓(平均 0.433 倍,即较对照组下降 2.3 倍)降低。

2. 骨内注射及存活曲线:第 0 天的时候给予小鼠 4.8 Gy X 线照射,后连续 7 d 给予雷帕霉素 $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 第 2 天给予不同方法输注细胞(1×10^7 细胞), A 组仅仅给予照射及雷帕霉素处理;B 组不进行任何处理;C 组骨内注射消化后的骨内膜细胞,D 组骨内注射冲出的 CBMC,E 组给予侧尾静脉注射冲出的 CBMC, 细胞数量均为 1×10^7 细胞。结果如图 2。对于小鼠存活天数取平均值,EBMC 平均存活 21.5 d,较静脉注射和 CBMC(分别平均存活 18 d 和 15 d)高,可见 EBMC 可以较单纯注射 CBMC 和静脉注射细胞更好地诱导同种异体皮片的存活。

3. 比较骨内注射细胞前后两群细胞的表达:在骨内注射 CBMC 后,4 周后处死经过骨内注射细胞的小鼠,依照上述方法取出 CBMC 和 EBMC,将两种细胞的全 RNA 提取后反转录,所得数据与未做处理的细胞进行对比。结果显示:注射后 4 周的 CBMC 的 Foxp3 平均增加了 2 倍,IL-10 增加了 4 倍;而注射后 4 周的 EBMC 的 IL-10 和 TGF- β 分别增加了 2.09 倍和 0.2 倍(即将为原来的 1/5);而 CXCL-12 降低为原来的 22%, Foxp3 降低为原来的 12.3%, N-cadherin 13.3%, Sfrp1 降低为原来的 28.6%。见图 3。

4. 比较前后 EBMC、CBMC 表达的差异:将 EBMC 各基因的表达与 CBMC 的进行对比,并将此结果与未处理小鼠所得数据进行比较,进行统计学分析。结果如图 4 所示:进行骨内注射 CBMC 4 周后小鼠 EBMC,除了 CXCL-12 较注射之前表达量降低外(从注射前较 CBMC 平均增高 7.05 倍到注射后仅为 CBMC 表达量的 79%),其他细胞因子(TGF- β 、N-cadherin、IL-10 等)的表达均与未注射之前相比较无统计学差异。

讨 论

CBMC 和 EBMC 两群细胞在未进行任何处理(包括照射及免疫抑制药物)时,其与 Treg 细胞相关的基因(Foxp3、IL-10)表达较 CBMC 高,且以 IL-10 升高最为显著,TGF- β 表达较 CBMC 低。这一现象与 Fujikaji 等^[13]2011 年 Nature 中的论文实验数据相符:在骨髓中 IL-10 是 Treg 发挥保护造血干细胞功能的主要介导分子,而不是 TGF- β 。Treg 是一种具有免疫调节作用的 T 细胞^[15],其粗略地分为胸腺中自然存在的调节性 T 细胞(nTreg)和诱导型调节性 T 细胞(iTreg),而 iTreg 中又有一群高表达 IL-10,少量表达 TGF- β ,不表达 IL-4、Foxp3 的细胞^[16],称为 1 型调节性 T 细胞(Tr1)。本实验说明,小鼠在未进行任何处理(包括照射及免疫抑制药物)之前,其 EBMC 中可能有一定数量的 Treg,而且这群 Treg 细胞特征性地高表达 IL-10,并与 Tr1 有一定

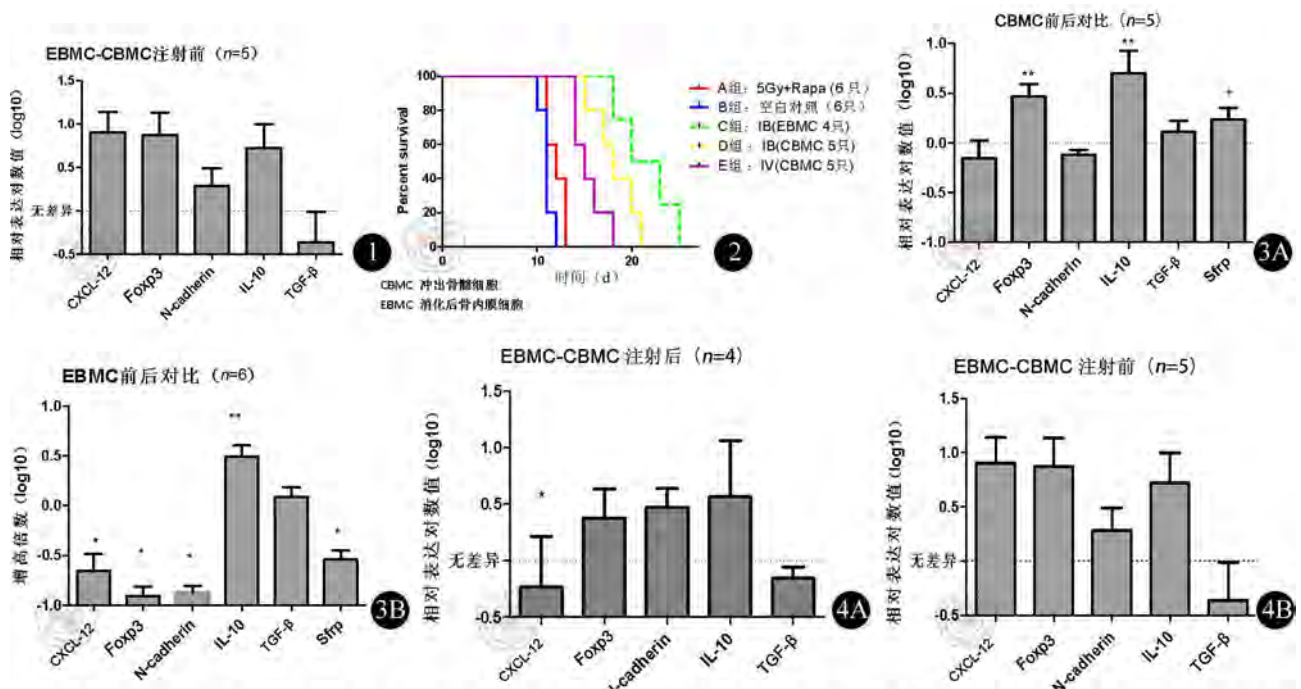


图1 未经处理小鼠EBMCs及CBMCs表达差异。横坐标为各基因名称, 纵坐标为个基因的相对表达量(数据经过对数处理, 底数为10, 当纵坐标为0时, 表明相对表达量为1, 比较两者无差异) **图2** 小鼠皮片存活曲线: 横坐标为小鼠异体皮片存活的天数, 纵坐标为小鼠皮片的存活比例。图中每个节点表示, 小鼠移植皮片排斥。A组为5 Gy+Rapa组; B组为不进行任何处理; C组为骨内注射EBMCs (1×10^7 的细胞); D组为骨内注射CBMCs (1×10^7 的细胞); E组为静脉注射CBMCs (1×10^7 的细胞) **图3** 注射前后各基因相对表达的对比: 横坐标为各个基因名称, 纵坐标为荧光定量PCR所得的相对表达量(经过对数处理, 底数为10)。CBMC及EBMC各基因注射前后分别比较, 并进行统计学分析, *表示比较有统计学差异, $P < 0.05$ **图4** 注射前后EBMC及CBMC表达对比的变化: 横坐标为各个基因名称, 纵坐标为荧光定量PCR所得的相对表达量(经过对数处理, 底数为10)。以CBMC作为参照, 获得EBMC的相对表达量, 后再以处理前EBMC CBMC的相对表达量为参照, 前后比较, 并进行统计学分析。*表示各组比较有统计学差异, $P < 0.05$

的相关性。这一关联性的证实还需要 Treg 细胞分选和细胞内细胞因子流式细胞检测等进一步证实。

另外, 本实验中未进行任何处理时, EBMC 的 CXCL-12 表达较 CBMC 高。而许多文献证实骨髓腔区域并非骨髓腔, 是骨髓细胞移植后供体造血干细胞^[5,14]定植的主要部位。CXCL-12^[17-18] 又是造血干细胞及 Treg 等细胞迁移重要的趋化因子。本实验数据表明骨髓在未经任何处理(包括照射及免疫抑制药物)时, EBMC 可能已经分泌 CXCL-12, 以诱导造血干细胞及 Treg 迁移, 一定程度上证实了骨髓腔区域较骨髓腔有着独特的生理作用, 更易诱导造血干细胞等细胞的迁移。

骨内注射细胞前后的 CBMC 及 EBMC 表达经过前后比较可以发现: 在移植后 4 周, 小鼠的 CBMC 的 CXCL-12 的比例没有明显的改变, 而 IL-10 和 Foxp3 的表达升高; 而骨髓腔区域仅 IL-10 明显的升高, 其他因子(包括 CXCL-12、N-cadherin、Foxp3)均出现了明显的降低。该现象说明: 在经过放射并进行骨内注射异体 CBMC 后 4 周的小鼠中, 骨髓腔和骨髓腔区域细胞均高表达 IL-10 用于保护供体来源细胞。而 IL-10 的高表达是否由 Treg 细胞分泌 IL-10, 还需要利用流式细胞分选

及细胞内细胞因子测定和 Western blot 进行测定。Cancelas 等^[19]的实验表明, 照射后早期(1 周内), CBMC 中的 CXCL-12 升高, 并可以诱导造血干细胞及间充质细胞的定植, 以恢复骨髓功能。而本实验中, CBMC 中的 CXCL-12 没有明显的升高, 不同的是本实验骨髓细胞取自照射及骨内注射细胞后 4 周, 可能此时的小鼠诱导外来细胞重建的过程已经结束, CXCL-12 的表达反而较注射前没有明显变化, 而 EBMC 的 CXCL-12 表达的降低, 可能表明在预处理后 4 周, 此时的 EBMC 并不诱导造血干细胞及 Treg 迁移, 相反其中造血干细胞可能反而向外迁移帮助诱导骨髓的重建。具体细胞因子随时间的变化趋势, 还有待于实验中设置不同的时间点, 并对造血干细胞进行分选计数, 进一步全面的动态分析。

注射前后骨内注射细胞 4 周 EBMC 及 CBMC 的各基因表达相互比较, 并前后对比可以发现: EBMC 相对于 CBMC 的仅 CXCL-12 降低, 而 Foxp3、N-cadherin、TGF-β 等均没有明显的改变。但是图 1 可见, 预处理之前 EBMC 较 CBMC 的 CXCL-12 表达明显升高, 然而图 4 中可示 CBMC 前后表达量没有明显的变化。这一数据说明预处理后 4 周, EBMC 中 CXCL-12 表达量的

下降是由于 EBMC 本身的表达降低所致,而不是 CBMC 的 CXCL-12 表达升高而导致的相对降低。这种现象证实了:EBMC 在预处理后 4 周,其并不分泌 CXCL-12 以诱导造血干细胞定植和归巢,但其中 Treg (IL-10、Foxp3) 相关因子较 CBMC 表达升高的现象没有发生显著的改变,仍然保持着一定的优势。

本实验中在骨内输入 1×10^7 供体来源的 EBMC 细胞后,受体小鼠对于异体皮片的存活可以较静脉或者骨内输注 CBMC 有一定的延长。在骨内注射细胞诱导异体心脏^[8]、肝脏^[9]等实验中,其他预处理条件不变的情况下,骨内注射 CBMC 较静脉注射 CBMC 细胞可以更好地诱导免疫耐受,但是其原理并不清楚。EBMC 骨内注射更有利于诱导免疫耐受的原因可能是:骨内注射 EBMC,既将供体的细胞直接输注到受体小鼠骨髓腔去,又使得供体来源的保护性 Treg 及各种间充质细胞^[19]直接定植于受体的骨髓腔内;骨髓中的骨内膜区域是造血干细胞迁移定植的重要区域,而将供体 EBMC 输注到受体骨髓腔中,无需经过血液循环进行归巢,可能更有利于将供体的 EBMC 重新定位回归到骨内膜区域,从而发挥其正常的生理作用。但是 EBMC 是否较 CBMC 更易迁移到骨内膜区域,还需要 CFSE 标记等活体追踪实验进行进一步的研究。心脏或者肝脏组织的移植,在经过了致死剂量照射(9 ~ 11 Gy)和注入 3×10^6 的细胞的预处理后,心脏移植体和肝脏可以长期存活^[8-9]。但是由于本实验仅仅采用了较低剂量的照射,可能是无法诱导异体长期存活的原因;此外,皮肤是人体组织抗原性最强的组织^[20],这也是皮肤移植在此模型中没有达到长期存活的原因之一。所以,还需要改变照射剂量或者其他预处理方案,以达到最有效诱导免疫耐受的目的。

综上所述,EBMC 骨内注射可以更好地诱导异体皮片的存活,其中 IL-10 表达的增高及 Treg 细胞可能发挥了一定的作用,这为骨髓移植诱导异体皮片存活提供了一个新的视角。

参 考 文 献

- [1] Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*, 1978, 4: 7-25.
- [2] Lord BI, Testa NG, Hendry JH. The relative spatial distributions of CFUs and CFUc in the normal mouse femur. *Blood*, 1975, 46: 65-72.
- [3] Zhang J, Niu C, Ye L, et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature*, 2003, 425: 836-841.

- [4] Calvi L M, Adams GB, Weibrecht KW, et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*, 2003, 425: 841-846.
- [5] Song J, Kiel MJ, Wang Z, et al. An in vivo model to study and manipulate the hematopoietic stem cell niche. *Blood*, 2010, 115: 2592-2600.
- [6] Haylock DN, Williams B, Johnston HM, et al. Hemopoietic stem cells with higher hemopoietic potential reside at the bone marrow endosteum. *Stem Cells*, 2007, 25: 1062-1069.
- [7] Kushida T, Inaba M, Hisha H, et al. Intra-bone marrow injection of allogeneic bone marrow cells: a powerful new strategy for treatment of intractable autoimmune diseases in MRL/lpr mice. *Blood*, 2001, 97: 3292-3299.
- [8] Guo K, Inaba M, Li M, et al. Long-term donor-specific tolerance in rat cardiac allografts by intrabone marrow injection of donor bone marrow cells. *Transplantation*, 2008, 85: 93-101.
- [9] Okazaki S, Hisha H, Mizokami T, et al. Successful acceptance of adult liver allografts by intra-bone marrow-bone marrow transplantation. *Stem Cells Dev*, 2008, 17: 629-639.
- [10] 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. *Stem Cells*, 2008, 26: 2211-2216.
- [11] Shima C, Adachi Y, Shi M, et al. The combination method using magnetic beads and a magnet helps sustain the number of donor BM cells after intra-BM injection, resulting in rapid hematopoietic recovery. *Bone Marrow Transplant*, 2010, 45: 993-999.
- [12] Peled A, Petit I, Kollet O, et al. Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science*, 1999, 283: 845-848.
- [13] Fujisaki J, Wu J, Carlson AL, et al. In vivo imaging of Treg cells providing immune privilege to the haematopoietic stem-cell niche. *Nature*, 2011, 474: 216-219.
- [14] Renstrom J, Istvanffy R, Gauthier K, et al. Secreted frizzled-related protein 1 extrinsically regulates cycling activity and maintenance of hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*, 2009, 5: 157-167.
- [15] Dummer CD, Carpio VN, Gonçalves LF, et al. FOXP3⁺ regulatory T cells: from suppression of rejection to induction of renal allograft tolerance. *Transpl Immunol*, 2012, 26: 1-10.
- [16] Fujio K, Okamura T, Yamamoto K. The Family of IL-10-secreting CD4⁺ T cells. *Adv Immunol*, 2010, 105: 99-130.
- [17] Dar A, Kollet O, Lapidot T. Mutual, reciprocal SDF-1/CXCR4 interactions between hematopoietic and bone marrow stromal cells regulate human stem cell migration and development in NOD/SCID chimeric mice. *Exp Hematol*, 2006, 34: 967-975.
- [18] Edinger M, Hoffmann P. Regulatory T cells in stem cell transplantation: strategies and first clinical experiences. *Curr Opin Immunol*, 2011, 23: 679-684.
- [19] Cancelas JA. Adhesion, migration, and homing of murine hematopoietic stem cells and progenitors. *Methods Mol Biol*, 2011, 750: 187-196.
- [20] Joffre O, Santolaria T, Calise D, et al. Prevention of acute and chronic allograft rejection with CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T lymphocytes. *Nat Med*, 2008, 14: 88-92.

(收稿日期:2013-01-07)

(本文编辑:戚红丹)