

重组慢病毒 GV303 Rat IL-33 体外转染原代大鼠骨髓间充质干细胞的研究

姚雪雁, 杨薇, 李海波, 许惠卓

基金项目: 湖南省自然科学基金 (No. 12JJ3120)

作者单位: (410008) 中国湖南省长沙市, 中南大学湘雅医院眼科

作者简介: 姚雪雁, 硕士研究生, 研究方向: 葡萄膜炎、眼底病。

通讯作者: 许惠卓, 博士, 主任医师, 研究方向: 葡萄膜炎、眼底病。xhz1030@163.com

收稿日期: 2016-11-17 修回日期: 2017-04-12

Establishment of rat bone mesenchymal stem cells expressing IL-33

Xue - Yan Yao, Wei - Yang, Hai - Bo Li, Hui - Zhuo Xu

Foundation item: Natural Science Foundation of Hunan Province (No. 12JJ3120)

Department of Ophthalmology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China

Correspondence to: Hui-Zhuo Xu. Department of Ophthalmology, Xiangya Hospital Central South Hospital, Changsha 410008, Hunan Province, China. xhz1030@163.com

Received: 2016-11-17 Accepted: 2017-04-12

Abstract

• **AIM:** To explore a way to establish a rat bone mesenchymal stem cell (BMSC) line expressing Interleukin (IL)-33.

• **METHODS:** BMSCs were isolated from 6-week-old Wistar Rat. GV303 virus was used as a IL-33 gene carrier to transfect isolated BMSCs. Three days later, transfected BMSCs were observed under a fluorescence microscope. The expression level of IL-33 of transfected BMSCs was detected by Western blot and ELISA.

• **RESULTS:** The BMSCs were successfully isolated, since flow cytometry results showed that rat BMSCs CD90 and CD29 positive, CD45, CD34 and CD11b negative. Furthermore, BMSCs were able to be differentiated to osteoblasts, adipocytes and chondrocytes respectively. Green fluorescence of GFP BMSCs was observed under the fluorescence microscope 3d after virus transfection. Expression of IL-33 was detected by Western blot and ELISA in the transfected rat BMSCs.

• **CONCLUSION:** A rat BMSC cell line expressing IL-33 was established by GV303 virus transfection.

• **KEYWORDS:** Interleukin - 33; transfect; bone mesenchymal stem cells; experimental autoimmune uveitis

Citation: Yao XY, Yang W, Li HB, et al. Establishment of rat bone mesenchymal stem cells expressing IL-33. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2017;17(5):841-845

摘要

目的: 探索构建稳定表达 IL-33 的原代大鼠骨髓间充质干细胞 (BMSC) 细胞系的方法。

方法: 体外分离、培养、鉴定大鼠骨髓间充质干细胞, 并进行 ELISA 实验检测转染前 IL-33 的表达情况。构建 GV303 Rat IL-33 慢病毒载体, 并进行慢病毒的包装。3d 后荧光显微镜下观察 GFP 的表达, 分别使用 Western blot、ELISA 检测转染后的 BMSC 中 IL-33 的表达。

结果: 大鼠 BMSC 被成功分离并传代, 流式细胞术鉴定 BMSC 可得到 CD90、CD29 为阳性, CD11b、CD45、CD34 为阴性, 与之前的文献报道相符。并且 BMSC 被成功诱导分化为骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞。对转染前的 BMSC 行 ELISA 实验检测 IL-33 的表达, 结果为阴性。病毒转染 3d 后于荧光显微镜下可观察到 GFP 的表达; ELISA 实验检测转染后 BMSC 中 IL-33 的表达, 结果为阳性; Western blot 亦可以检测到 IL-33 的表达。

结论: 应用 GV303 慢病毒载体可以建立稳定表达 IL-33 的大鼠 BMSC 原代细胞系。

关键词: IL-33; 转染; 骨髓间充质干细胞; 实验性自动免疫性葡萄膜炎

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2017.5.09

引用: 姚雪雁, 杨薇, 李海波, 等. 重组慢病毒 GV303 Rat IL-33 体外转染原代大鼠骨髓间充质干细胞的研究. *国际眼科杂志* 2017;17(5):841-845

0 引言

IL-33 是 IL-1 的家族成员之一, 主要表达于起机械屏障功能的上皮细胞中, 当局部屏障受损时, IL-33 作为警报素调控免疫应答^[1]。在眼球, IL-33 主要表达于视网膜的色素上皮细胞和内核层。之前已有文献报道, 腹腔注射重组的 IL-33 可以明显改善实验性自动免疫性葡萄膜炎 (EAU) 鼠的眼部炎症症状^[2]。大鼠骨髓间充质干细胞 (BMSC) 是一种成体干细胞, 分离简单, 且具有低免疫原性, 近年来被广泛地应用于免疫类疾病的研究。BMSC 在大鼠及小鼠 EAU 模型中也已被证实, 可以有效地抑制葡萄膜炎的发生和发展^[3], 长期研究还发现间充质干细胞较之糖皮质激素, 能对葡萄膜炎动物模型发挥更为持久的抑制炎症反应效果, 且副作用更少^[4]。故本实验拟采用慢病毒转染的方式, 建立能稳定表达 IL-33 的 BMSC 细胞系, 以期为进一步进行葡萄膜炎的动物实验奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 实验动物: SPF 级雄性 Wistar 大鼠, 6 周龄, 体质量 180~200g, 由北京维通利华动物中心提供。本实验项目已通过中南大学湘雅医院动物伦理委员会审查。主

要试剂:DMEM/F12 培养基,胎牛血清,0.25%胰蛋白酶(Gibco)、双抗(Gibco)、小鼠抗大鼠CD90(BD公司)、小鼠抗大鼠CD45(BD公司)、小鼠抗大鼠CD34(BD公司)、小鼠抗大鼠CD29(BD公司)、小鼠抗大鼠CD11b(BD公司)。成脂分化诱导试剂盒(GIBCO),成骨分化诱导试剂盒(GIBCO),成软骨分化诱导试剂盒(GIBCO)。油红染色剂(Amesco),茜素红染色剂(Amesco),阿利新蓝染色剂(Amesco)。大鼠IL-33 ELISA试剂盒(RD公司),IL-33兔抗鼠抗体(NOVUS公司),慢病毒载体GV303(上海吉凯基因生物技术有限公司)等。主要仪器:超净工作台(BIOBASE)、细胞培养箱(Thermo)、水浴锅(上海博讯医疗)、离心机(Thermo)、荧光倒置显微镜(NIKON)、酶标仪(BECKMAN)、流式细胞仪(美国BD公司)、电泳仪(BIO-RAD)、摇床(其林贝尔仪器)、凝胶显影仪(BIO-RAD)、低温冰箱(海尔)。

1.2 方法

1.2.1 BMSC 的分离、培养、分化及鉴定

颈椎脱臼法处死 Wistar 大鼠,75%酒精浸泡 5min,无菌条件下分离股骨和胫骨。DMEM/F12 培养基冲洗骨髓腔直至骨头发白。收集冲洗液至 50mL 离心管里 1 000r/min,离心 5min,然后用含 12% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基 8mL 重悬所得细胞,接种在大培养皿中。置入 37℃、含 50mL/L CO₂ 专用细胞培养箱里培养。72h 后换液,保留贴壁细胞。此后每 48h 换液一次,直至细胞融合度达到 80%,即可传代。采用 1:2 传代方法,将贴壁细胞消化下来,离心后再用含 12% 胎牛血清的 DMEM/F12 完全培养液重悬分装到两个大皿中,即完成一次传代。

取生长状态较好的第四代 BMSCs,待细胞汇合度达到 80%后,用 0.25% 胰酶消化 1min,1 000r/min 离心 5min,弃上清后用 PBS 洗 2 次,重悬,配制成浓度为 1×10⁶ 个/mL 的细胞悬液。取 500μL 上述细胞悬液,加入 PE 标记的各表型抗体 10μL。室温孵育 60min,PBS 洗涤后用流式细胞仪检测 CD90、CD29、CD34、CD45、CD11b 的表达,最后用 Flowjo7.6 软件进行分析。

BMSC 具有干细胞的特性,收集第四代细胞,加入成脂诱导液,每 3~4d 换一次分化液,经过 14d 的分化培养后,用油红进行染色检测 BMSC 向脂肪细胞分化的情况;在成骨分化中取第四代细胞加入成骨诱导液,每 3~4d 换一次分化液。经过 14d 的分化培养后,用茜素红进行染色以检测 BMSC 向成骨分化的情况;在软骨分化中取第四代细胞,加入成软骨诱导分化液,每 3~4d 换一次分化液,经 14d 的分化培养后,用阿利新蓝进行染色检测 BMSC 向软骨细胞的分化情况^[5]。分别于显微镜下观察染色后分化细胞的形态并拍照。

1.2.2 转染前 BMSC 表达 IL-33 的检测

无菌操作台中收集慢病毒转染前第四代 BMSC 的培养上清,1 000r/min,离心 5min,吸取上层清液。然后按照大鼠 IL-33 ELISA 试剂盒使用说明操作上样,最后放入酶标仪中检测吸光值。

1.2.3 IL-33 慢病毒载体的构建、包装、收集和浓缩

本实验所使用的慢病毒载体为 GV303,扩增所用引物为:IL-33-F: 5'-GAGGATCCCCGGGTACCGGTGCCACCATGAGACCTAGAATGAAGTATTC-3', IL-33-R: 5'-CACACATTCACAGGCTAGTTACATCTTAGAGAGCTTAAAC-3'。扩增片段为 841bp。两端酶切位点为 AgeI / NheI。

转染前 24h,用胰蛋白酶消化对数生长期的 HEK

293FT 细胞,接种于 10cm² 细胞培养皿,37℃、50mL/L CO₂ 培养箱内培养。24h 后待细胞密度达 80% 时即可用于转染;向一灭菌离心管中加入所制备的各 DNA 溶液(GV303-IL-33 载体质粒 10μg、Helper 质粒 10μg)及 Lipo2000 50μL。混合均匀,在室温下温育 20min;将混合液缓慢滴加至 HEK 293FT 细胞的培养液中,混匀,培养 6h 后弃去含有转染混和物的培养基,缓慢加入含 12% 血清的细胞培养基 20mL,于 37℃、含 50mL/L CO₂ 培养箱内继续培养 48~72h。转染后 48h 收集 HEK 293FT 细胞上清液。于 4℃、4 000r/min 离心 10min,除去细胞碎片。以 0.45μm 滤器过滤上清液于 40mL 超速离心管中;将带有病毒上清液的超速离心管逐一放入至 Beckman 超速离心机内,4℃、25 000r/min,离心时间为 2h;弃上清,尽量去除残留在管壁上的液体,加入细胞培养基,轻轻反复吹打重悬。即可得到浓缩的慢病毒载体。

1.2.4 IL-33 慢病毒转染 Wistar 大鼠 BMSCs 细胞

取生长状态较好的第四代 BMSCs 重悬后调整细胞密度为 1×10⁶ 个/mL,每孔取 500μL 加入 12 孔板正中,置于细胞专用培养箱中培养,待细胞融合度达到 80%后,标记为三组:对照组、GFP 空载体组、IL-33 慢病毒组。后两组分别加入 GFP 空载体及 IL-33 慢病毒(感染复数 MOI 为 10)。3d 后于荧光显微镜下观察转染后的细胞并拍照。

1.2.5 转染后 BMSC 表达 IL-33 的检测

收集转染后 3d 的 BMSCs 细胞的培养基,1 000r/min 离心 5min,收集上清液按照大鼠 IL-33 ELISA 试剂盒说明书的操作步骤上样,最后将样品放入酶标仪中检测吸光值,读数。本实验采用大鼠 IL-33 ELISA 试剂盒检测 IL-33 慢病毒转染大鼠骨髓间充质干细胞前后培养基上清中 IL-33 的表达。将标准品稀释为 1 000、500、250、125、62.5、31.2pg/mL 6 组,加上未稀释的标准品 2 000pg/mL 和空白对照组(标准品稀释液),一共是 8 组。按照试剂盒说明书的操作处理,在酶标仪 450nm 波长检测标准品、空白对照组和样品组的吸光值(OD)。

收集转染后的 BMSCs 细胞,采用 Western blot 的方法检测 IL-33 的表达。培养皿用 2mL PBS 洗 1 次,再次加入 1mL PBS,用细胞刮轻柔刮下贴壁的 BMSC 细胞,打匀后加入 1.5mL EP 管中 1 000r/min 离心 5min。弃上清,所得沉淀即为我们需要的细胞,加入 RIPA 裂解液后置冰上裂解 30min,然后进行蛋白定量制备电泳样品。然后取蛋白样品置于 SDS-PAGE 凝胶中电泳,待样品条带接近凝胶底部时停止电泳。4℃、120V 恒压电转移至 PVDF 膜上。转膜结束后,取出 PVDF 膜加入质量分数为 50g/L 的脱脂牛奶中,室温封闭 1h,TBST 洗 3 次后加入一抗(兔抗鼠 IL-33 和 β-actin 抗体)室温孵育 30min 后放入 4℃ 冰箱过夜。次日从冰箱中取出 PVDF 膜,室温复温 30min 后,TBST 洗 3 次,然后加入二抗(羊抗兔 IgG),室温孵育 1h 后 TBST 洗 3 次,最后采用鲁米诺化学发光法检测。以 β-actin 作为内参对照。

统计学分析:采用 Excel 表格以 OD 值为横坐标(x 轴),以对应的浓度为纵坐标(y 轴),作标准品散点图。进行一元线性回归分析,得到一元回归方程结果。将所测得的样品组 OD 值的平均值依次代入一元回归方程即可计算出样品组中 IL-33 的浓度。

2 结果

2.1 大鼠 BMSC 的分离、培养、分化及鉴定

BMSC 培养

前 72h,由于培养基中混有大量血细胞,故培养基较混浊,无法观察细胞的形态。72h 后可观察到少量细胞突起,细胞贴壁生长;此后每 48h 换液一次,5d 后细胞体积增大,数量增多,呈梭形,旋涡状排列,聚集生长。传代后细胞生长迅速,约 48h 即可达到 80% 融合度,即可再次传代,见图 1。BMSC 具有干细胞特性,在一定的诱导条件下可分化为脂肪细胞、骨细胞、软骨细胞。我们收集第四代细胞,分别加入成脂、成骨、成软骨的诱导分化液培养 14d 左右,再分别进行染色,在显微镜下可以观察到 BMSC 细胞被成功地诱导分化为脂肪细胞、骨细胞、软骨细胞。见图 2。收集第四代细胞用流式细胞术检测表面特异性抗原,结果显示 CD90、CD29 为阳性,CD11b、CD45、CD34 为阴性,与文献所述相符,见图 3。

2.2 IL-33 慢病毒载体的构建、包装、收集和浓缩 将得到的浓缩慢病毒载体于荧光显微镜下观察可以看到明显的绿色荧光,见图 4。

2.3 IL-33 慢病毒转染 Wistar 大鼠 BMSCs 细胞 转染后 3d 于荧光显微镜下观察时,可以看到对照组 BMSC 细胞无荧光,GFP 空载体组和 IL-33 病毒组显示正常荧光。表明病毒转染 BMSC 成功,见图 5。

2.4 转染前 BMSC 表达 IL-33 的检测 收集转染前的第四代 BMSC 细胞的培养液,离心后收集上清,按照大鼠 IL-33 ELISA 试剂盒说明书的操作步骤上样,最后将样品放入酶标仪中检测吸光值,读数。代入图 6B 所示标准曲线回归方程后结果显示转染前的 BMSC 不分泌 IL-33,见图 6C。

2.5 转染后 BMSC 表达 IL-33 的检测 收集转染后 3d 的 BMSC 细胞的培养基,离心后收集上清液按照大鼠 IL-33 ELISA 试剂盒说明书的操作步骤上样,最后将样品放入酶标仪中检测吸光值,读数。然后代入图 6B 所示的标准曲线回归方程中即可得到图 6C 所示数据。数据显示三组中,IL-33 慢病毒组转染后的 BMSC 表达 IL-33,对照组与 GFP 空载体转染组均不表达 IL-33。

收集三组 BMSC 细胞行 Western blot 检测,可以看到对照组无特异性蛋白的表达条带,GFP 空载体转染组只表达 GFP,IL-33 病毒转染组既表达 GFP 又表达 IL-33,见图 6A。这表明 IL-33 慢病毒组成功转染了 BMSC 细胞,与上面的 ELISA 检测结果相吻合。

3 讨论

葡萄膜炎是一类常见的严重眼病,具有很强的致盲性。患者以中青年居多,在发达国家可造成 10% 盲目,在发展中国家可造成 25% 的盲目^[6]。其中非感染性葡萄膜炎为重要组成部分,这类葡萄膜炎一般查不出特异性病原体且伴有免疫系统的损伤,具有反复发作、并发症多、预后差等特点。在临床上治疗棘手,一直是眼科领域研究的热点。现在主要的治疗方法是以类固醇激素和免疫抑制剂为主,但是长期应用副作用明显,所以亟需寻找更安全、更有效的治疗方法。

IL-33 是 IL-1 的家庭成员之一,主要表达于起机械功能的上皮和内皮细胞中,当屏障受损时,IL-33 参与免疫应答^[1]。有研究报道 IL-33 主要在视网膜的色素上皮层和内核细胞层中表达。而色素上皮细胞层是血-眼屏障的重要组成部分,其功能与结构的不完整被认为是葡萄

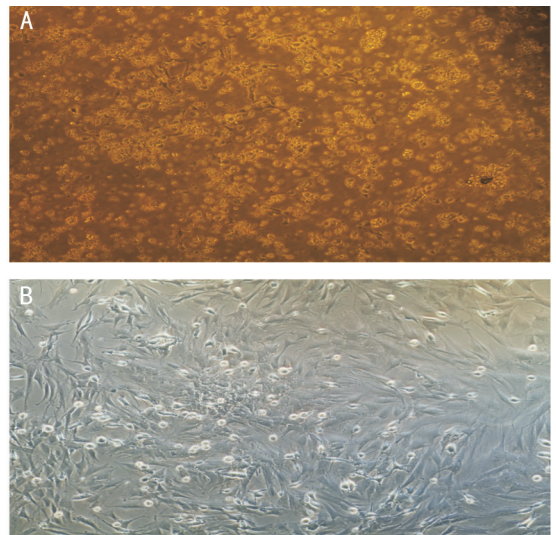


图 1 大鼠 BMSC 的分离和培养 A:大鼠原代 BMSC(P₀),分离培养 72h 后培养基较混浊,可观察到少量干细胞突起,细胞贴壁生长($\times 40$);B:大鼠原代 BMSC(P₃),干细胞呈梭形、旋涡状排列,贴壁聚集生长($\times 40$)。

膜炎发生与发展中的一个重要环节。有实验证实与 BALB/c 小鼠相比,C57BL/6 小鼠眼内色素上皮细胞的 IL-33 表达量很低,因而这种小鼠更容易被诱导产生自身免疫性疾病^[2]。而临床研究也发现,活动期白塞氏病患者血清中的 IL-33 含量较非活动期患者和健康人低。最新研究显示 IL-33 通过腹腔注射能显著改善小鼠 EAU 的严重性^[2],研究表明在 IL-33 处理的 EAU 小鼠的淋巴结和脾脏中 IFN- γ ⁺和 IL-17⁺ CD4⁺ T 细胞数目减少,IFN- γ 和 IL-17 的生成降低。同时 IL-5⁺和 IL-4⁺ CD4⁺ T 细胞的数目增加,IL-5 的生成增加^[2]。此外 IL-33 也诱导了小鼠 M2 型巨噬细胞活化。这些结果提示我们 IL-33 改变了 T 细胞反应,将损伤性 Th1/Th17 反应转向保护性 Th2 反应,并提高了保护性 M2 型巨噬细胞的比率^[7]。

因此深入研究 IL-33 在葡萄膜炎发病中的作用机制具有重要意义,而在葡萄膜炎发病期间合理应用 IL-33 有可能为葡萄膜炎的发生与发展提供重要的保护作用。

虽然文献中已经报道 IL-33 具有显著的改善实验性自身免疫性葡萄膜炎动物眼部炎症表现的作用,但其必须通过持续腹腔注射才能维持疗效,不再复发,若此生物疗法应用于临床,势必给葡萄膜炎患者带来较重的经济负担。有没有方法可以使 IL-33 能够在体内长期稳定表达以达到无需重复注射就能维持较好的疗效呢?

骨髓间充质干细胞是一种成体干细胞,来源于中胚层,于 1968 年由 Friedenstien 首次从骨髓中分离出来,分离方法简单,操作容易。近年来,骨髓间充质干细胞一直是研究的热点,其在葡萄膜炎基础研究领域也多有报道。BMSCs 在大鼠及小鼠 EAU 模型中已被证实,可以有效地抑制葡萄膜炎的发生和发展^[8],长期研究还发现间充质干细胞较之糖皮质激素,能对葡萄膜炎动物模型发挥更为持久的抑制炎症反应效果,且副作用更少^[4]。另外,由于 BMSC 具有自动归巢炎症及损伤区域、低免疫原性及相对静止、更新率较低、存活时间长的特性^[9-10],已被许多研究作为载体工具细胞使用。结果显示外源基因导入 BMSCs 后可以持续表达较长时间,是作为载体工具细胞的一个良

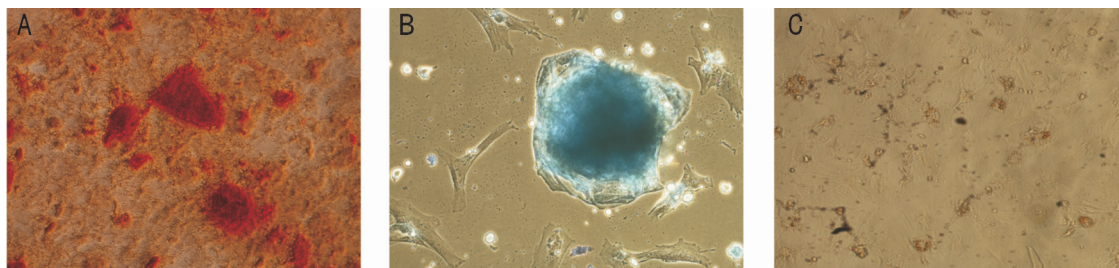


图2 大鼠 BMSC 细胞的诱导分化鉴定 (×100) A:成骨分化;B:成软骨分化;C:成脂分化。

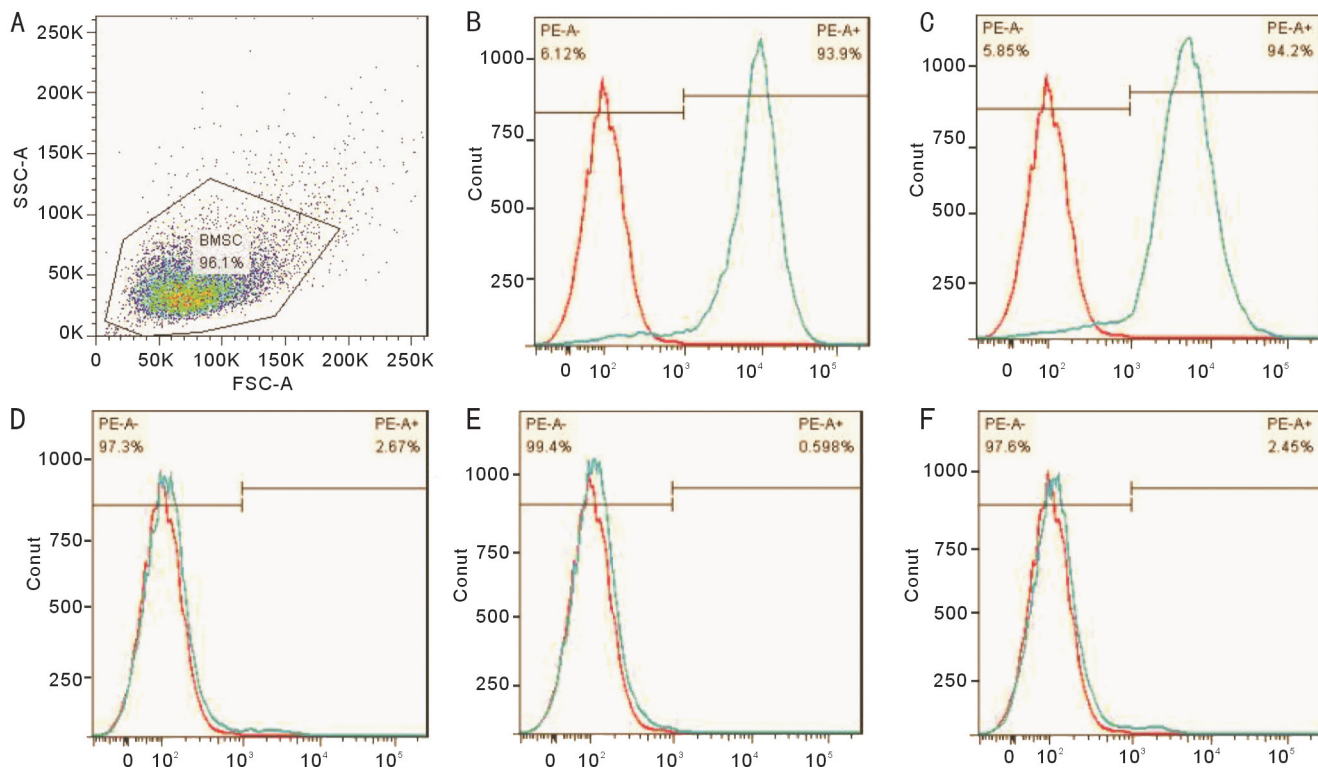


图3 大鼠 BMSC 细胞的流式表面标记物的鉴定 A:分离培养的细胞中符合干细胞特性的占 96.1%;B:CD90 表达为阳性;C:CD29 表达为阳性;D:CD11b 表达为阴性;E:CD34 表达为阴性;F:CD45 表达为阴性。

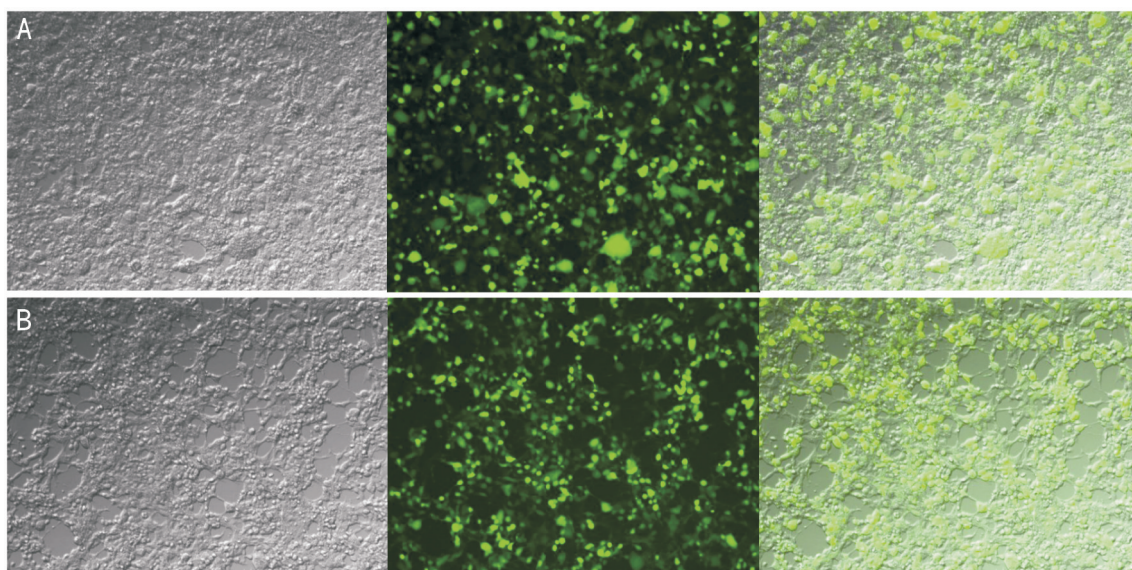


图4 IL-33 慢病毒载体构建及病毒的包装使用 GV303 慢病毒载体,包装细胞为 HEK 293FT 细胞,两组均能观察到绿色荧光,表明 IL-33 慢病毒载体构建成功 (×100) A:空载体病毒组在明视野与绿色荧光下拍照所见; B:IL-33 慢病毒组在明视野与绿色荧光下拍照所见。

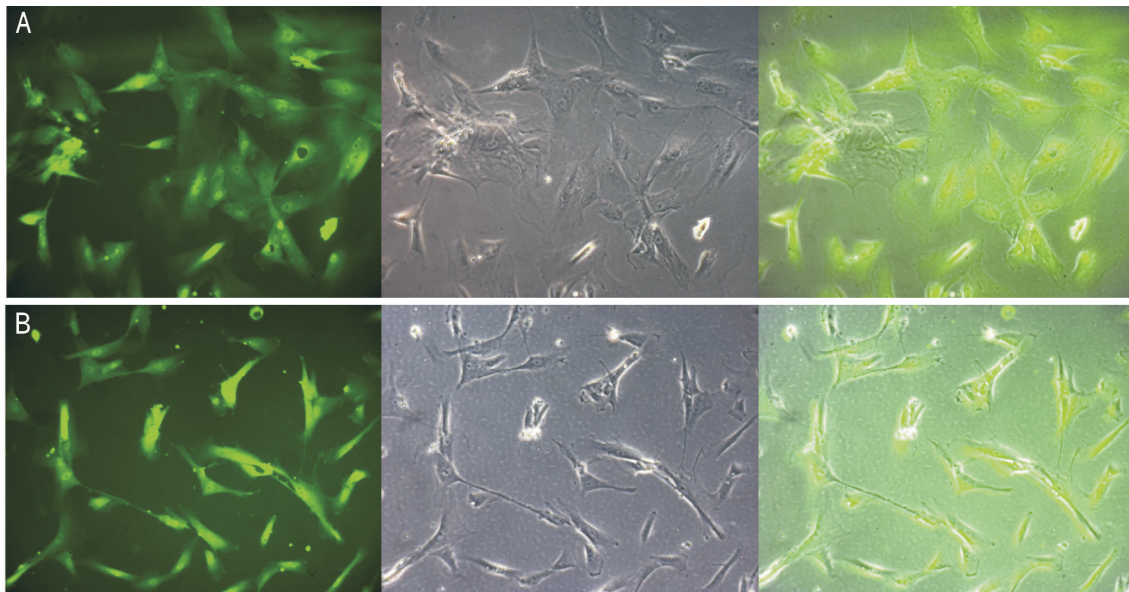


图5 大鼠 BMSC IL-33 慢病毒的转染两组均能观察到绿色荧光,表明 IL-33 慢病毒组成功转染大鼠 BMSC 细胞($\times 100$) A:空载体病毒组转染 BMSC 后在明视野与绿色荧光下拍照所见; B:IL-33 慢病毒组转染 BMSC 后在明视野与绿色荧光下拍照所见。

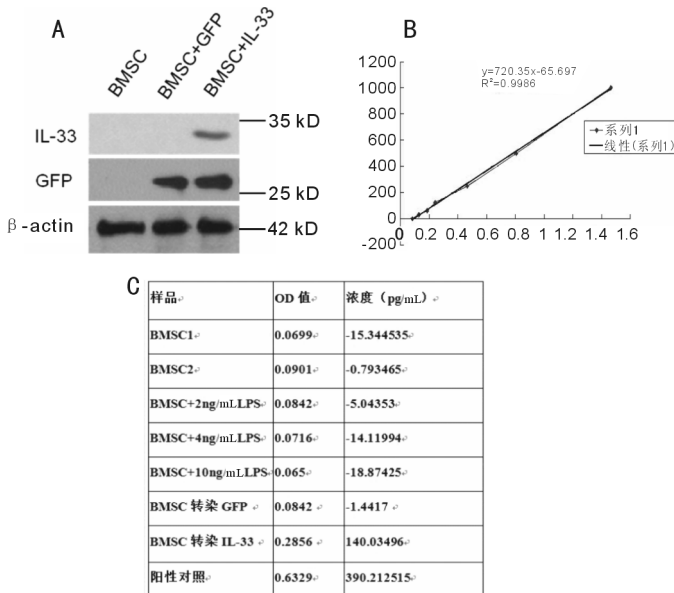


图6 大鼠 BMSC 中 IL-33 慢病毒转染前后 IL-33 的表达及检测 A:Western blot 示对照组无特异性蛋白的表达条带,GFP 空载体转染组只表达 GFP,IL-33 病毒转染组既表达 GFP 又表达 IL-33。这表明 IL-33 病毒组成功转染了 BMSC 细胞; B:ELISA 实验所得到的标准品一元回归方程及标准曲线; C:代入一元回归方程后所得到的转染前后对照组、空载体转染组、IL-33 慢病毒载体转染组表达 IL-33 的浓度。结果表明转染前对照组及空载体转染组不表达 IL-33,而 IL-33 慢病毒载体转染组转染 BMSC 后成功表达 IL-33。

好选择^[11]。目前已经有利用同种异体来源的 BMSCs 的临床应用的报道,强烈的免疫排斥反应在这些报道中尚没有发现^[12]。BMSCs 在细胞治疗和基因治疗中具有广阔的应用前景。故而我们选择了 BMSC 作为 IL-33 慢病毒转染的细胞载体。

IL-33 慢病毒转染 BMSCs 后我们成功地检测到了

BMSCs 表达 IL-33,实验证明稳定表达 IL-33 的 BMSC 细胞系构建成功,为下一步探索实验性自动免疫性葡萄膜炎的治疗方法提供了坚定的理论基础。

参考文献

- Martin NT, Martin MU. Interleukin 33 is a guardian of barriers and a local alarmin. *Nat Immunol* 2016;17(2): 122-131
- Barbour M, Allan D, Xu H, et al. IL-33 attenuates the development of experimental autoimmune uveitis. *Eur J Immunol* 2014; 44 (11): 3320-3329
- Li G, Yuan L, Ren X, et al. The effect of mesenchymal stem cells on dynamic changes of T cell subsets in experimental autoimmune uveoretinitis. *Clin Exp Immunol* 2013; 173(1): 28-37
- Zhang L, Zheng H, Shao H, et al. Long-term therapeutic effects of mesenchymal stem cells compared to autoimmune uveitis of rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014; 55(9): 5561-5571
- 胡佳乐,徐之明,徐立军,等. 人骨髓间充质干细胞多项分化的诱导与鉴定. *实用癌症杂志* 2013;28:9-11
- Uveitis Group of Chinese Ophthalmological Society Chinese Medical A. Top ten research progresses of ocular immunology in China. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi* 2015; 51(10): 773-777
- Molofsky AB, Savage AK, Locksley RM. Interleukin-33 in tissue homeostasis, injury, and inflammation. *Immunity* 2015; 42(6): 1005-1019
- 李广达. 间充质干细胞治疗大鼠自身免疫性葡萄膜炎的机制研究. 天津:天津医科大学 2012
- 秦静. 骨髓间充质干细胞的免疫原性特点及其免疫调节能力. *现代免疫学* 2010;30(6):515-519
- 李鲁生,张涵,王成俊. 骨髓间充质干细胞的分离方法及生物学特性. *中国组织工程研究与临床康复* 2010;14(10):1869-1873
- Tian Y, Deng YB, Huang YJ, et al. Bone marrow derived mesenchymal stem cells decrease acute graft versus host disease after allogeneic hematopoietic stem cells transplantation. *Immunol Invest* 2008;37:29-42
- Rusmusson I, Ringden O, Sundberg B, et al. Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms. *Exp Cell Res* 2005;305:33-41