

论著·基础研究

小鼠胎肝单个核细胞行骨髓腔内注射重建造血系统的效果

伊庆福¹, 迟亚男¹, 刘光辉^{2,3}, 杨冠恒^{2,3}, 龚秀丽^{2,3}, 范书玥¹, 曾凡一^{1,2,3}

1. 上海交通大学基础医学院组织胚胎学与遗传发育学系, 上海 200025; 2. 上海交通大学附属儿童医院, 上海交通大学医学遗传研究所, 上海 200040; 3. 卫生部医学胚胎分子生物学重点实验室暨上海市胚胎与生殖工程重点实验室, 上海 200040

[摘要] **目的**·观察用小鼠胎肝单个核细胞悬液行骨髓腔内注射以重建小鼠造血系统的效果。**方法**·用 Ficoll 分离技术获取胎龄 13.5 d 的小鼠胎肝单个核细胞悬液, 采用磁珠分选的方法获得造血干细胞 (hematopoietic stem cell, HSC) 并计数。以骨髓腔内注射的方法对 ¹³⁷Cs 辐射清髓后的小鼠股骨进行小鼠胎肝单个核细胞移植。对移植后的受体小鼠通过血常规检测、血涂片及骨髓涂片镜检的方法观察造血系统的重建情况。对受体小鼠移植后 1 年骨髓中的供体 HSC 进行流式细胞检测。**结果**·胎龄 13.5 d 的小鼠胎肝单个核细胞中 HSC 占 0.171%。小鼠胎肝单个核细胞移植后 1 周, 外周血即能检测到供体细胞来源的血细胞; 移植后第 3 周受体小鼠外周血白细胞、红细胞、血红蛋白基本恢复至辐照前水平; 第 5 周外周血中供体细胞来源的血细胞比例趋于稳定; 移植后 1 年受体小鼠骨髓中的 HSC 基本来自供体细胞。**结论**·小鼠胎肝单个核细胞通过骨髓腔内注射的移植方法能高效重建小鼠造血系统。

[关键词] 造血干细胞; 骨髓腔内注射; 胎肝; 小鼠

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2019.10.002 **[中图分类号]** Q462 **[文献标志码]** A

Intra-bone marrow injection of fetal liver mononuclear cells to reconstruct the hematopoietic system in mice

YI Qing-fu¹, CHI Ya-nan¹, LIU Guang-hui^{2,3}, YANG Guan-heng^{2,3}, GONG Xiu-li^{2,3}, FAN Shu-yue¹, ZENG Fan-yi^{1,2,3}

1. Department of Histoembryology, Genetics & Development, Shanghai Jiao Tong University College of Basic Medical Sciences, Shanghai 200025, China; 2. Shanghai Institute of Medical Genetics, Shanghai Children's Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200040, China; 3. Key Laboratory of Embryo Molecular Biology, Ministry of Health; Shanghai Key Laboratory of Embryo and Reproduction Engineering, Shanghai 200040, China

[Abstract] **Objective**·To observe the effect of intra-bone marrow injection (IBMI) of fetal liver mononuclear cell suspension on reconstructing the hematopoietic system in mice. **Methods**·The fetal liver mononuclear cells (HSCs) were obtained by Ficoll separation technique, and then the hematopoietic stem cells (HSCs) were obtained by magnetic bead sorting. The fetal liver mononuclear cells were injected into the tibias of ¹³⁷Cs irradiated mice by IBMI. The recipient mice were observed for reconstitution of the hematopoietic system by routine blood examination, blood smear and bone marrow smear. The donor HSCs in the bone marrow of the recipient mice was subjected to flow cytometry 1 year after transplantation. **Results**·HSCs accounted for 0.171% in the mouse fetal liver mononuclear cells. One week after transplantation of mouse fetal liver mononuclear cells, blood cells derived from donor cells were detected from peripheral blood; in the third week after transplantation, peripheral blood leukocytes, red blood cells and hemoglobin of recipient mice were restored to the pre-irradiation levels; the percentage of donor-derived blood cells in peripheral blood in the fifth week was stable; the HSCs in the bone marrow of recipient mice were derived from donor cells 1 year after transplantation. **Conclusion**·The murine fetal liver mononuclear cells can efficiently reconstruct the hematopoietic system of mice by IBMI.

[Key words] hematopoietic stem cell (HSC); intra-bone marrow injection (IBMI); fetal liver; mouse

造血干细胞 (hematopoietic stem cell, HSC) 是可自我更新并能向各系血细胞分化的一类细胞。HSC 移植可治疗恶性血液病、遗传代谢性疾病和先天性免疫缺陷等相关疾病^[1-2]。目前 HSC 的来源主要是骨髓 HSC、骨髓动员后外周血采集的 HSC 和脐带血 HSC, 但供体细胞来源紧张, 且该问题在我国尤为突出, 致使可受治患者的数量极

其有限, 因此迫切需要探寻替代的可移植 HSC。HSC 除了个体体内获取外, 其他研究较多的是通过多能性干细胞体外分化形成, 或通过体细胞的转分化形成。但由于在胚胎发育过程中, 造血细胞如何形成及其形成的调控机制尚未阐明, 所以体外分化或转分化方式目前均不能有效地得到具有移植造血重建功能的 HSC。目前所知, 胎

[基金项目] 国家重大科学研究计划 (2014CB964700); 上海市自然科学基金 (16ZR1428600) (National Major Scientific Research Plan, 2014CB964700; Natural Science Foundation of Shanghai, 16ZR1428600)。

[作者简介] 伊庆福 (1989—), 男, 硕士生; 电子信箱: 18101925435@163.com。

[通信作者] 曾凡一, 电子信箱: fzenng@sjtu.edu.cn。

龄 8.5 ~ 9.5 d 的小鼠胚胎卵黄囊的造血岛开始发生原始造血, 随后造血区域转移至主动脉-性腺-中肾 (aorta-gonad-mesonephros, AGM) 区^[3-6]; 胎龄 10.5 d 后开始发生胎肝造血; 16 d 后, 胎肝造血逐渐转向骨髓腔内造血。刘兵团队在胚胎早期成功地获得了造血干细胞前体 (pre-HSC), 并经分析鉴定, CD201 为这类细胞的表面标志物^[7]; 随后他们与兰雨课题组合作首次揭示了在小鼠胚胎发育过程中, AGM 区 HSC 及其前体细胞的功能具有异质性, 这些功能不同的细胞具有时空差异特征, 其中淋系髓系平衡型 (β 型) 具有较高的自我更新能力和造血重建潜能^[8]。这些突破性的研究为探寻胚胎发育早期主要功能性造血重建的 HSC 类型及相关的再生医学提供了理论依据。胎龄 13.5 d 的小鼠胎肝中含有丰富的不同分化阶段的肝干细胞、HSC 和间充质干细胞^[9], 相比骨髓 HSC, 其造血体系可能含有增殖分化潜能更强的 HSC, 且整个体系的免疫原性和免疫反应性更低^[10]。由于其造血区域相对集中, 因此研究胚胎期髓外造血、挖掘具有造血功能作用的胎肝细胞, 以及分析微环境支持细胞对于造血形成和造血维持的调控作用, 对于进一步分析造血形成机制及 HSC 的开发应用均有十分重要的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 C57BL/6-HS23-GFP 转基因小鼠 (简称 HG 小鼠)^[11] 为红系高表达绿色荧光蛋白 (GFP) 的转基因小鼠, 由本实验室自建, 生产许可证号为 SCXK (沪) 2014-0002。取同品系小鼠交配后孕 13.5 d 的雌性 HG 小鼠, 用此小鼠的胎鼠胎肝作为供体, 通过示踪外周血 GFP 阳性细胞, 可探测到供体细胞在血液中的动态比例变化。C57BL/6-CD45.1⁺ 小鼠 (简称 CD45.1 小鼠) 购自上海南方模式生物科技股份有限公司, 生产许可证号为 SCXK (沪) 2017-0010; 同品系交配繁殖, 取胎鼠胎肝作为供体, 根据标志物 CD45.1 可用流式细胞术检测追踪到受体小鼠骨髓细胞中的供体细胞。C57BL/6 小鼠 (简称 C57 小鼠) 购自上海南方模式生物科技股份有限公司; 同品系交配繁殖, 取出生后 6 周龄雌性小鼠作为胎肝 HSC 移植的受体小鼠。本研究的实验动物均饲养于上海市儿童医院的实验动物屏障设施内, 使用许可证号为 SYXK (沪) 2018-0030。相关的动物实验已通过上海市儿童医院实验动物管理及伦理委员会的审查 (审查意见书编号为 LLSC2016019), 所有动物实验操作均符合该委员会的伦理要求并在其监督下进行。

1.1.2 主要试剂 瑞氏-吉姆萨染色液 (BA40170, 贝索, 中国), 淋巴细胞分离液 (Ficoll, Axis-Shield, 挪威), 系别细胞去除试剂盒 (Lineage Cell Depletion Kit)、造血干细胞分选试剂盒 (Anti-Sca-1 MicroBead Kit) (Miltenyi Biotec, 德国), PE 标记的 CD45.1 抗体 (CD45.1-PE 抗体)、FITC 标记的干细胞抗原 1 抗体 (Sca-1-FITC 抗体)、FITC 标记的 c-Kit 抗体 (c-Kit-FITC 抗体) (BD, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 胎肝造血组分构成分析 取 10 只胎龄 13.5 d 的 C57 小鼠胎肝和 2 只成年 C57 小鼠两侧股骨与胫骨的骨髓, 制备成单细胞悬液, Ficoll 分离液分离单个核细胞 (mononuclear cell, MNC), 用系别细胞去除试剂盒去除成熟造血细胞及其定向祖细胞, 获取 lineage-negative (Lin⁻) 细胞, 随后再用造血干细胞分选试剂盒获取干细胞抗原 1 阳性 (Sca-1⁺) 细胞, 最终计数分析胎肝与骨髓的造血细胞组分。

1.2.2 供体小鼠胎肝 MNC 悬液制备 取胎龄 13.5 d 的雄性小鼠胎肝, 用枪头打碎成单细胞, 细胞滤器过滤, 除去细胞团块, 用 Ficoll 分离液分离 MNC。

1.2.3 受体小鼠的准备 取 12 只 6 周龄雌性 C57 小鼠于复旦大学放射研究所放射科行 ¹³⁷Cs 致死量 (9 Gy) 辐照 10 min 清髓。将这 12 只清髓后的小鼠均分为 2 组, 分别为对照组和移植组, 每组 6 只, 移植组接受 HG 小鼠胎肝 MNC 移植, 对照组不作任何处理。观察 2 组的存活情况。

1.2.4 胎肝 MNC 移植 清髓 12 h 内, 通过骨髓腔内注射 (intra-bone marrow injection, IBMI) 的方法给予移植组小鼠右后肢胫骨胎肝 MNC 悬液 20 μ L (细胞数量约 1×10^7)。

1.2.5 血液学检测 另取 8 只雌性 C57 小鼠, 按上述方法辐照清髓后移植 HG 小鼠胎肝 MNC, 定期通过尾静脉采集受体小鼠外周血进行血常规检测及制备血涂片。移植后 1 周处死 2 只小鼠, 取移植侧及对侧股骨骨髓, 制备骨髓涂片。荧光显微镜下观察血涂片及骨髓涂片。

1.2.6 瑞氏-吉姆萨染色 移植后 8 周, 处死余下的 6 只受体小鼠, 制作外周血涂片和骨髓涂片, 滴加瑞氏-吉姆萨 A 液染色 1 min, 再滴加 B 液染色 3 min, 蒸馏水冲洗后, 在普通光学显微镜下观察红细胞形态、白细胞数量。

1.2.7 受体小鼠的骨髓细胞中 HSC 的来源 按上述方法将 3 只 C57 小鼠清髓作为受体, 制备胎龄 13.5 d 的 CD45.1 小鼠胎肝 MNC 悬液, 骨髓腔内注射法注射约 1×10^7 个 MNC 于受体小鼠右后肢胫骨。受体小鼠移植 1 年后处死, 取骨髓细胞, Ficoll 分离液分离 MNC。用 CD45.1-PE 抗体、Sca-1-FITC 抗体、c-Kit-FITC 抗体标记,

随后进行流式细胞术检测。

1.3 统计学方法

使用 Excel 2019 软件进行数据分析，血常规指标的比
较采用方差分析， $P<0.01$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 胎肝功能性造血细胞组分

成熟血细胞和定向祖细胞均会表达相应的细胞标志分

子 (lineage-positive)^[12]，而骨髓细胞中的 HSC 均为 Lin⁻
细胞，其中 Lin⁻Sca-1⁺ 细胞为造血功能性细胞，在小鼠胎
肝中 Lin⁻Sca-1⁺ 细胞是具有长期造血功能的细胞亚群^[13]。
10 只胎鼠胎肝经 Ficoll 分离后得到 MNC 约 3.22×10^7 个，
其中 Lin⁻ 的细胞占 0.994%，Lin⁻Sca-1⁺ 的细胞占 0.171%。
2 只成熟雌鼠双侧股骨与胫骨的骨髓细胞中分离得到的
MNC 与 10 只胎鼠的胎肝相近，为 3.12×10^7 个，其中
Lin⁻ 细胞占 1.801%，Lin⁻Sca-1⁺ 细胞占 0.721% (表 1)。
说明胎龄 13.5 d 小鼠的胎肝中也含有造血功能性细胞，即
HSC。

表 1 胎肝与成年小鼠骨髓中造血细胞组分构成
Tab 1 Composition of hematopoietic cells in fetal livers and adult mice bone marrows

| 来源 | n | 细胞总数 / 个 | MNC | | Lin ⁻ 细胞 | | Lin ⁻ Sca-1 ⁺ 细胞 | |
|----|----|--------------------|--------------------|------------|---------------------|---------------|--|---------------|
| | | | 细胞数量 / 个 | 占总数百分比 / % | 细胞数量 / 个 | 占 MNC 百分比 / % | 细胞数量 / 个 | 占 MNC 百分比 / % |
| 胎肝 | 10 | 1.24×10^8 | 3.22×10^7 | 25.97 | 3.20×10^5 | 0.994 | 5.50×10^4 | 0.171 |
| 骨髓 | 2 | 7.74×10^7 | 3.12×10^7 | 40.31 | 5.62×10^5 | 1.801 | 2.25×10^5 | 0.721 |

2.2 受体小鼠移植后的存活情况

经 ¹³⁷Cs 致死量辐照后，移植组小鼠 8 周存活率为
5/6，对照组小鼠均在辐照 1 ~ 7 d 内死亡。移植组的 1 只
小鼠在辐照后 10 d 死亡，表现为尾部溃烂，疑为采血后
感染所致，除此之外并未发现其他症状或体征，也无明显
移植后免疫排斥的相应症状。

2.3 受体小鼠骨髓涂片镜检结果

受体小鼠接受 HG 小鼠胎肝 HSC 移植后 1 周，取移
植侧股骨及对侧股骨腔内的骨髓制作涂片，均观察到大量
GFP 阳性细胞 (图 1)。该结果说明供体来源的 GFP 阳性
细胞在受体小鼠体内存活，并发生迁移。

2.4 受体小鼠外周血涂片镜检结果

移植组小鼠在移植后 1 ~ 8 周每周采集外周血，制作

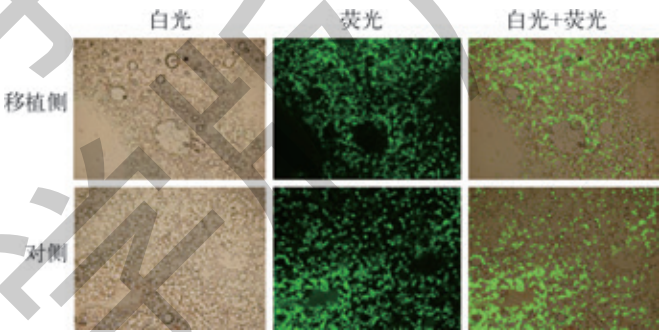


图 1 受体小鼠移植后 1 周的股骨骨髓涂片 (×100)
Fig 1 Bone marrow smears of femora in recipient mice 1 week after transplantation (×100)

血涂片，并在荧光显微镜下观察，结果发现移植后 1 周外
周血中已出现少量的 GFP 阳性细胞，并且随着时间推移，
比例逐渐增多，至第 5 周趋于稳定 (图 2)。

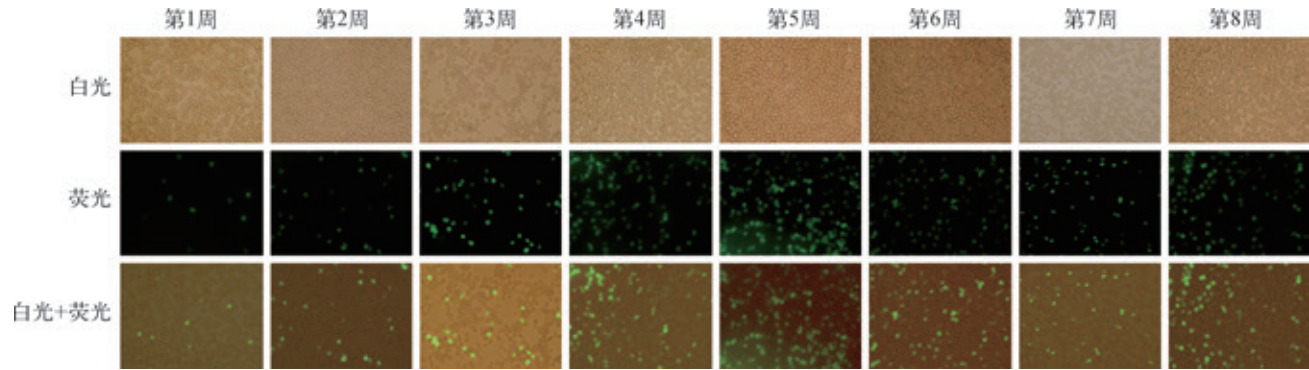
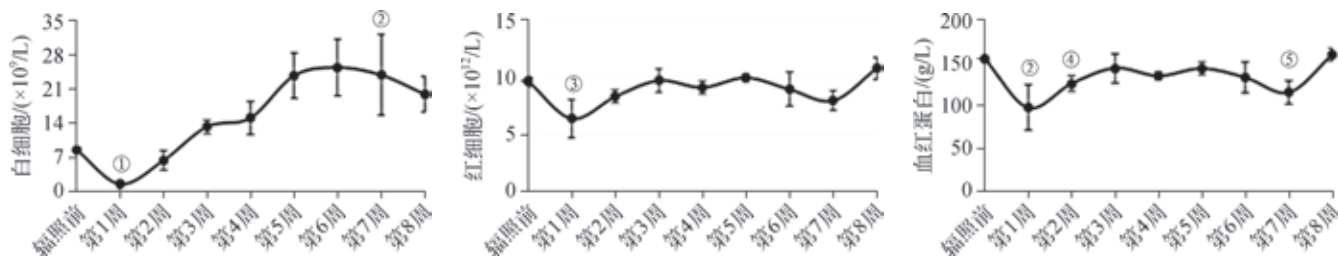


图 2 受体小鼠移植后 1 ~ 8 周的外周血涂片 (×200)
Fig 2 Peripheral blood smears of recipient mice 1-8 weeks after transplantation (×200)

2.5 受体小鼠外周血常规检测结果

于辐照前和移植后 1~8 周对受体小鼠进行血常规检查, 移植后第 1 周白细胞、红细胞和血红蛋白均明显下

降, 但均在第 2 周开始恢复, 第 3 周基本恢复至辐照前水平; 其中白细胞在第 5 周升至较高水平, 红细胞和血红蛋白则基本维持在辐照前的水平 (图 3)。



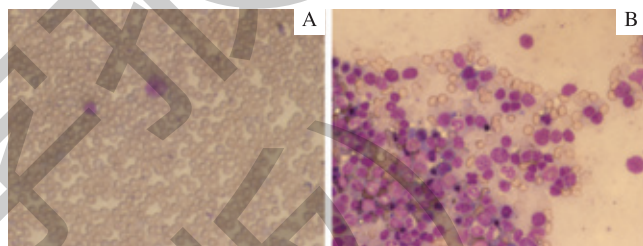
注: ① $P=0.001$, ② $P=0.006$, ③ $P=0.009$, ④ $P=0.004$, ⑤ $P=0.003$, 与辐照前比较

图 3 受体小鼠移植后 1~8 周的血常规检测指标

Fig 3 Routine blood test indexes in recipient mice 1-8 weeks after transplantation

2.6 受体小鼠血涂片和骨髓涂片染色结果

移植后 8 周, 取小鼠血液和骨髓涂片后行瑞氏-吉姆萨染色, 结果显示红细胞呈典型的双凹圆盘状形态, MNC 及白细胞的形态和数量并无异常, 说明移植后骨髓造血功能正常, 呈正常的造血活跃状态 (图 4)。



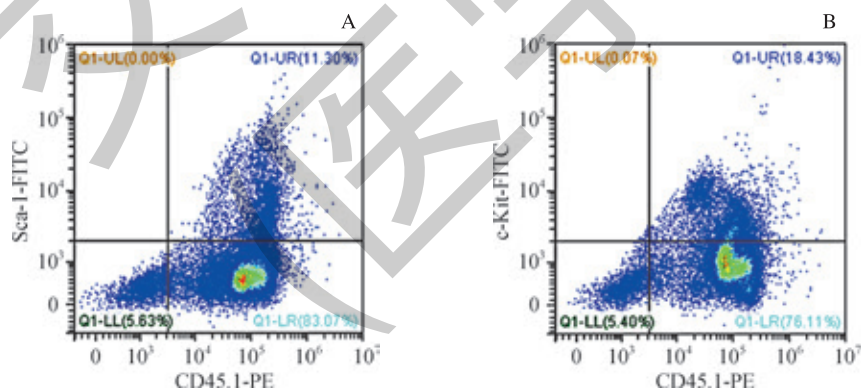
注: A. 血涂片; B. 骨髓涂片

图 4 受体小鼠移植后 8 周的血涂片和骨髓涂片 (瑞氏-吉姆萨染色, $\times 200$)

Fig 4 Blood smear and bone marrow smear of recipient mice 8 weeks after transplantation (Wright-Giemsa staining, $\times 200$)

2.7 受体鼠骨髓细胞中 HSC 的流式检测分析

受体鼠移植 CD45.1 小鼠胎肝 MNC 后 1 年, 经 Ficoll 分离的骨髓细胞中, 含有 94% 及以上的 CD45.1⁺ 供体细胞, 另外 100% 的 Sca-1⁺ 细胞和 99.6% 的 c-Kit⁺ 细胞为 CD45.1⁺ 细胞, 说明均来自供体 CD45.1 小鼠 (图 5)。



注: A. Sca-1⁺ 细胞流式检测; B. c-Kit⁺ 细胞流式检测

图 5 受体小鼠移植后 1 年骨髓细胞中供体来源的 HSC 占比分析

Fig 5 Analysis of donor-derived HSC ratio in bone marrow cells of recipient mice 1 year after transplantation

3 讨论

HSC 移植的目的是实现高效且安全稳定的造血系统重建。临床上通常采用的是骨髓 HSC, 近年来脐带血 HSC 也逐渐被应用于临床治疗, 但供体来源紧张依然是无法回避的问题。有效的 HSC 移植需要同时满足高质量的供体

细胞和高效的移植途径 2 个条件。本研究探索的是如何有效地应用胚胎发育早期胎肝 HSC 进行造血功能重建。

胎肝在胚胎发育早期作为一个造血器官具有其特殊性: 胎肝造血处于 AGM 区与骨髓造血期之间, 其造血细胞具有完全的造血功能且较成体更强; 由于处于发育时期, 其 HSC 的免疫原性可能更弱; 并且此时期的造血部

位较集中, 不像骨髓造血系统那样分散, 因此胎肝 HSC 的获取更为简单。虽然胎肝获取在伦理上尚无定论, 可参考目前临床肝脏、肾脏等移植器官来源的伦理, 具体还有待进一步的伦理学论证。HSC 和生血龛支持细胞构成一个完整的造血系统, 这样的混合共移植有助于造血微环境的重建和维持 HSC 的活性, 并实现再生、扩增及多系分化。

移植方法对造血功能重建效率至关重要, 目前临床上主要采用骨髓腔内移植和静脉输注移植 2 种方法^[14-15]。经静脉输注的 HSC 在归巢的过程中, 会滞留在非造血器官, 部分供体细胞的无效归巢致使造血效率下降^[3, 16]。而骨髓腔内注射移植途径可使 HSC 有效归巢, 造血重建效率大为提高^[17-18]。Kushida 等^[19]研究发现, 通过骨髓腔内注射 HSC 移植免疫缺陷小鼠, 受体小鼠造血细胞几乎被供体细胞替换, 未发生免疫排斥反应, 且长期存活。与静脉输注相比, 骨髓腔内注射可使供体细胞高效归巢、快速重建造血系统, 且降低免疫排斥反应, 并能促进 T 细胞免疫功能的恢复^[20], 从而实现 HSC 的较高质量移植。

本研究采用密度梯度离心法, 分离获得胎龄 13.5 d 的 HG 小鼠胎肝的 MNC 作为供体细胞, 采用骨髓腔内注射移植方法, 对 ¹³⁷Cs 照射的野生型小鼠进行造血系统重建的研究。移植 7 d 后, 小鼠骨髓涂片和血液涂片荧光镜检可观察到 GFP 阳性细胞, 表明供体细胞开始发挥功能性造血作用, 并能有效地向血系细胞分化。通过血涂片周期性镜检观察, 第 5 周外周血 GFP 阳性细胞荧光比例趋于稳定, 说明造血

功能开始稳定。通过流式细胞术检测分析, 受体小鼠骨髓细胞中的 HSC 基本上完全由供体细胞替代重建造血。

HSC 移植是目前能有效治疗 α 或 β 地中海贫血、再生障碍性贫血、重症免疫缺陷等疾病的方法, 但骨髓 HSC 和脐带血 HSC 均来源紧张, 使其应用受到了极大的限制。胎肝 HSC 或造血前体细胞具有高效增殖、多系分化潜能、免疫原性低等特性。本研究表明, C57 小鼠用骨髓腔内注射方法进行胎肝 MNC 的移植, 可高效、安全、稳定地建立并恢复个体正常的造血功能。胎肝作为胚胎发育过程中特殊的造血形成部位, 由特定的造血系统构成(包括造血细胞和造血支持细胞), 其细胞能够植入骨髓腔并在体内高效重建造血。但胎肝造血系统中的各类细胞群如何有效地协同发挥造血功能, 目前尚不清楚。

随着高通量测序技术的迅猛发展, 胎肝造血组分的构成将有望得到进一步解析, 同时结合骨髓腔内注射这一技术, 胎肝 MNC 悬液中不同亚群细胞的不同功能也将得到进一步的探明。本研究所建立的技术体系, 对于造血形成过程中功能性细胞的深入挖掘, 及对于临床上如何应用这一体系来进一步提高 HSC 移植重建的有效性和安全性具有重要的作用。这一体系也提示未来可利用多能性干细胞高效模拟胚胎早期发育过程中胎肝的形成, 在分化的胎肝细胞中高效获得功能性 HSC 以进行临床转化应用, 从而挖掘出新的治疗策略以解决当前临床 HSC 移植面临的诸多问题。

参·考·文·献

- [1] Jun JB, Choi Y, Kim H, et al. BK polyomavirus encephalitis in a patient with thrombotic microangiopathy after an allogeneic hematopoietic stem cell transplant[J]. *Transpl Infect Dis*, 2016, 18(6): 950-953.
- [2] Halter JP, Michael W, Schubach M, et al. Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy[J]. *Brain*, 2015, 138(Pt 10): 2847-2858.
- [3] Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology[J]. *Cell*, 2008, 132(4): 631-644.
- [4] Kumaravelu P, Hook L, Morrison AM, et al. Quantitative developmental anatomy of definitive haematopoietic stem cells/long-term repopulating units (HSC/RUs): role of the aorta-gonad-mesonephros (AGM) region and the yolk sac in colonisation of the mouse embryonic liver[J]. *Development*, 2002, 129(21): 4891-4899.
- [5] Rhodes KE, Gekas C, Wang Y, et al. The emergence of hematopoietic stem cells is initiated in the placental vasculature in the absence of circulation[J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 2(3): 252-263.
- [6] de Bruijn MF, Speck NA, Peeters MC, et al. Definitive hematopoietic stem cells first develop within the major arterial regions of the mouse embryo[J]. *EMBO J*, 2000, 19(11): 2465-2474.
- [7] Zhou F, Li X, Wang W, et al. Tracing haematopoietic stem cell formation at single-cell resolution[J]. *Nature*, 2016, 533(7604): 487-492.
- [8] Ye H, Wang X, Li Z, et al. Clonal analysis reveals remarkable functional heterogeneity during hematopoietic stem cell emergence[J]. *Cell Res*, 2017, 27(8): 1065-1068.
- [9] Chagraoui J, Lepage-Noll A, Anjo A, et al. Fetal liver stroma consists of cells in epithelial-to-mesenchymal transition[J]. *Blood*, 2003, 101(8): 2973-2982.
- [10] Gotherstrom C, Ringden O, Tammik C, et al. Immunologic properties of human fetal mesenchymal stem cells[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2004, 190(1): 239-245.
- [11] Jia CP, Huang SZ, Yan JB, et al. Effects of human locus control region elements HS2 and HS3 on human β -globin gene expression in transgenic mouse[J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2003, 31(3): 360-369.
- [12] Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes *in vivo*[J]. *Nat Med*, 2000, 6(11): 1229-1234.
- [13] Jordan CT, Astle CM, Zawadzki J, et al. Long-term repopulating abilities of enriched fetal liver stem cells measured by competitive repopulation[J]. *Exp Hematol*, 1995, 23(9): 1011-1015.
- [14] Dacosta JC, Portuguese MW, Marinowicz DR, et al. Safety and seizure control in patients with mesial temporal lobe epilepsy treated with regional superselective intra-arterial injection of autologous bone marrow mononuclear cells[J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2018, 12(2): e648-e656.
- [15] Schmuck EG, Koch JM, Hacker TA, et al. Intravenous followed by X-ray fused with MRI-guided transcatheter mesenchymal stem cell injection improves contractility reserve in a swine model of myocardial infarction[J]. *J Cardiovasc Transl*, 2015, 8(7): 438-448.
- [16] He XC, Li Z, Sugimura R, et al. Homing and migration assays of hematopoietic stem/progenitor cells[J]. *Methods Mol Biol*, 2014, 1185: 279-284.
- [17] Zhang Y, Adachi Y, Suzuki Y, et al. Simultaneous injection of bone marrow cells and stromal cells into bone marrow accelerates hematopoiesis *in vivo*[J]. *Stem Cells*, 2004, 22(7): 1256-1262.
- [18] Mankidy R, Faller DV, Mabaera R, et al. Short-chain fatty acids induce γ -globin gene expression by displacement of a HDAC3-NCoR repressor complex[J]. *Blood*, 2006, 108(9): 3179-3186.
- [19] 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 [J]. *Blood*, 2001, 97(10): 3292-3299.
- [20] Ikehara S. A novel strategy for allogeneic stem cell transplantation: perfusion method plus intra-bone marrow injection of stem cells[J]. *Exp Hematol*, 2003, 31(12): 1142-1146.

[收稿日期] 2019-03-28

[本文编辑] 瞿麟平

