

第 X 章 干细胞

何其灵, 李刚

英国贝尔法斯特女王大学 医学院 创伤与骨外科系
Department of Trauma and Orthopaedic Surgery, School of Medicine,
Queen's University Belfast, Musgrave Park Hospital, Belfast, BT9 7JB, UK

间充质干细胞(MSCs, mesenchymal stem cells)具有向多种组织细胞类型分化的能力。人们首先在骨髓中确认了MSCs的存在, 此后, 又从许多其它组织中分离、鉴定出了这类细胞。骨髓, 脂肪组织, 骨膜, 骨骼肌, 成体外周血, 脐带血, 血管周皮细胞, 骨组织, 羊水, 脾脏以及真皮都可能成为MSCs的来源。其中, 人们对骨髓的MSCs研究最详尽、透彻; 骨髓是公认的含有MSCs的器官, 其体内应用有良好的前景。脂肪组织, 骨骼肌与骨膜也已被证明存在MSCs, 亦有可利用的价值。近年来, 有研究报道在成人外周血中发现了少量的MSCs, 然而, 从外周血中获取MSCs是否可行仍有待进一步的研究证实。如果可行, 那么简单的采血过程就会使对MSCs的采集更方便。尽管有证据表明MSCs也存在于脐血, 血管周皮细胞, 骨组织, 羊水, 脾脏以及真皮中, 但因为这些组织数量有限或不易采集, 故对它们的临床应用是有限的。

1 前言

在成人中, 新细胞的诞生往往要经历细胞增殖, 迁移, 分化及成熟这一系列的过程。在这一长链中的第一个细胞被命名为干细胞(stem cell)。干细胞具有克隆形成与自我更新的能力, 并且能够向多种细胞谱系分化。成体骨髓储蓄着两类不同的干细胞: 造血干细胞(haematopoietic stem cell)与基质干细胞(stromal stem cell)。前者是血细胞与破骨细胞的起源, 后者则是成骨细胞的祖先。在近期的文献中, "间充质干细胞"是最为常用的指称基质干细胞的名称。其它名称包括结缔组织干细胞(connective tissue stem cell), 基质干细胞, 基质成纤维样干细胞(stromal fibroblastic stem cell)。然而MSCs并不象它们的名字显示的那样多能, 它们并不能形成所有胚胎间充质所能够发育成的组织。间充质(mesenchyme)是胚胎中的一种特殊组织, 它不仅向肌肉, 骨及其它结缔组织发育, 而且能够发育成血细胞和其它细胞。MSCs是从胚胎间充质发育而来的细胞。^[1]直到近年, 成体干细胞(Adult stem cells)仍被认为只能向它们所在的组织的细胞分化。然而, 最近的研究表明这种认识是不正确的。例如, 造血干细胞能分化成肝细胞,^[2-3]神经干细胞能分化成血细胞。^[4]类似的, 间充质干细胞不仅能向成骨细胞分化, 也能向脂肪细胞,^[5]成软骨细胞,^[6]成肌细胞,^[7]星形细胞^[8]成纤维细胞^[9]分化。

认识到MSCs可分化成各种骨骼细胞, 那么就可以推断MSCs亦存在于各种骨骼组织(如脂肪组织, 肌肉组织等)中。人们甚至假设, MSCs在外周血中漫游, 并藉此广泛地分布于各种组织。基于MSCs有广泛的临床应用前景, 在此对MSCs的潜在来源作一次严谨的综述是十分必要的。

2 MSCs向成骨细胞(osteoblast)方向的分化

一个MSC分化成一个成骨细胞要经历四个主要阶段和五种主要的细胞类型。详见图1。

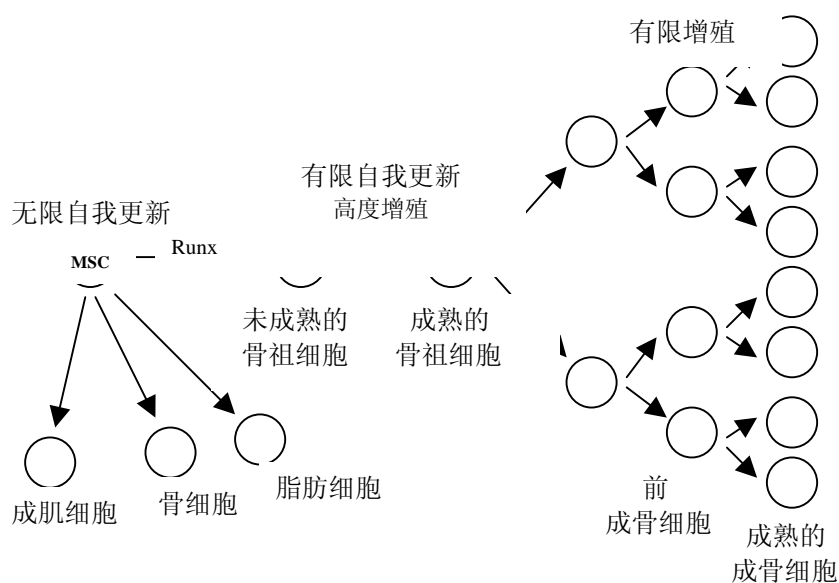


图 1 间充质干细胞的分化途径。改编自: Aubin JE, Triffitt JT. Mesenchymal stem cells and osteoblast differentiation. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, eds. Principles of Bone Biology. 3rd Edn. San Deigo: Academic Press 2002

这一分化过程由多个因子控制。Runx2 (以前称为Cbfa1成骨细胞特异性转录因子—核心结合因子) 对成骨细胞的发育至关重要。^[10] 在鼠中, 敲除 Runx2 基因将导致动物仅有软骨细胞和软骨, 而无成骨细胞与骨的骨骼系统。^[11] 除了Runx2外, MSCs参与软骨内成骨还需要印度毫猪蛋白(Indian Hedgehog; 一种分泌的生长因子), 但MSCs参与膜内成骨并不需要这种因子。^[12] 骨形态发生蛋白(BMPs, bone morphogenetic proteins)也是成骨细胞发育的重要调节因子。对于较成熟的成骨细胞, BMPs能促进成骨细胞的分化和骨基质的形成; 然而在成骨细胞发展的早期, 它们却抑制其分化而促进其增生。

2.1 成骨细胞的标记物(marker)

有许多标记物可用以识别 MSCs; 而成骨细胞则有更为特定的标记物。

表面标记物: 未成熟的骨祖细胞(osteoprogenitor)有大量可被检测到的表面标记物, 与这些表面标记物对应的抗体包括: Stro-1, SH-2, SH-3, SH4, SB10及HOP-26, ^[1] 这些表面标记物也能在MSCs中检测到。因此, 这些抗体不能用来确证定向骨祖细胞(committed osteoprogenitor)的存在, 但可用来识别那些具有向成骨细胞分化潜能的MSCs。**细胞与分子标记:** ^[13] 碱性磷酸酶(ALP, alkaline phosphatase)的骨/肾/肝 同形异构体的表达可见于成熟的骨祖细胞, 前成骨细胞(preosteoblast)及成熟的成骨细胞等这些在成骨分化链中较为成熟的细胞。MSCs或较不成熟的骨祖细胞并不表达ALP, ALP的表达随分化而增强。I 型胶原(type I collagen)在成骨细胞的分化链中除不成熟的骨祖细胞

之外的所有细胞中都有表达。尽管MSCs并不表达I型胶原，但由MSCs分化成的非成骨细胞却可表达I型胶原。因此，I型胶原不是一个决定性的成骨细胞鉴定指标。骨钙素(osteocalcin)在成熟的成骨细胞中有表达，但其表达量有较大差异，而且并不是所有的成熟的成骨细胞都表达。所以，骨钙素也许是成骨细胞的一个定性检测指标，但它是否能用于定量检测值得怀疑。成骨分化链上各分化阶段的细胞，包括前成骨细胞和成骨细胞都表达骨涎蛋白(bone sialoprotein)，但同样存在表达量的问题。成骨细胞分泌的矿化基质含有磷酸钙，可用茜草红 (Alizarin Red S)检测。

2.2 促进成骨方向分化的常用条件

不同研究者采用的促进MSCs向成骨方向分化的培养条件略有差异。图2是由Wickham等^[14]及Zuk等^[15]采用的比较有代表性的成骨培养条件。

DMEM (Dulbecco's modified eagle medium)
10%胎牛血清 (fetal bovine serum)
0.01 μ M 1,25 二羟维生素 D3 (1,25-dihydroxyvitamin D3) 或
0.1 μ M 地塞米松 (dexamethasone)
50 μ M 抗坏血酸-2-磷酸盐 (ascorbate-2-phosphate)
10 mM β -甘油磷酸钠 (β -glycerophosphate)
1% 抗生素 (antibiotic) [如，青霉素 (penicillin)，链霉素 (streptomycin)]

图 2 代表性成骨培养条件

3 公认的及潜在的 MSCs 的来源

3.1 骨髓

MSCs首先在骨髓中被发现。Friedenstein 是描述骨髓中MSCs的第一人，虽然他并没有首称其为MSCs。^[16]从此以后，对MSCs的研究大部分都是源自骨髓MSCs (BM-MSCs, bone marrow derived MSCs)。我们并不能肯定其它组织来源的MSCs具有与BM-MSCs完全一致的生物学特性。因此有必要以BM-MSCs为标准，研究并比较其它组织来源的MSCs。从骨髓提取的每 3.4×10^4 细胞中就有一个MSC，^[17]其含量相对高于其它组织来源。除了非定向的MSCs，骨髓还含有更多的定向骨祖细胞。对定向前体细胞 (committed progenitor) 的分析表明，其中 30%具有成骨/成软骨/成脂肪的分化潜能，剩余的细胞或具有成骨/成软骨分化潜能，或只有单纯的成骨分化能力。^[18]使用骨髓作为的MSCs来源，其不便之处主要在于抽取骨髓的过程需要由技术水平高超的专业人员完成，时间长达 20-30 分钟；患者必须接受局部麻醉[如，利多卡因(Lidocaine)]，并在操作完成后仰卧一个小时。^[19]绝大部分患者在骨髓抽取过程中会感到疼痛，超过三分之一的患者有长时期的中度到重度术后疼痛。^[20]而在一个位点可抽取的骨髓量通常不超过 2 毫升，^[14]因此，BM-MSCs在临床应用之前需要经过体外培养扩增。

MSCs参与体内骨重建，这在动物模型上已获得充分的证据。在三维支架材料的辅助下，经培养的BM-MSCs在小鼠体内形成了高度血管化的原始骨组织。^[21]运用MSCs在人体内成骨的临床试验已进行到第二期。据报道，一期临床试验中，MSCs被植入下颌牙龈部位，作为齿移植物，并获得成功。^[22]总之，骨髓是MSCs的好来源，但获取骨髓所要面临的实际操作问题及其伴发的疼痛并发症有可能限制其广泛的应用。

3.2 脂肪组织

近年来，大量研究工作支持脂肪组织也是MSCs的来源之一。研究者从动物^[23]和人体内多种脂肪，包括膝髌下脂肪垫，^[14]及脂肪抽吸物^[15]中均获得了脂肪MSCs（A-MSCs, adipose tissue derived MSCs）。然而，仅有一小部分经成骨条件培养的A-MSCs向成骨细胞分化，其余还是脂肪生成细胞。这一事实说明A-MSCs临床应用要将成骨细胞选择性地分离出来为佳。与骨髓相比，脂肪组织作为MSCs的来源，有许多优势。从实际操作的角度看，脂肪组织来源丰富，比骨髓易于提取（尽管麻醉是必要的），其提取量较大，而患者遭受的疼痛较轻。^[24]在某些培养条件下，研究者发现A-MSCs比BM-MSCs能产生更多的ALP；但是这种差异仅在早期（4天）显著。^[25]尽管已在大鼠上观察到A-MSCs能成骨，^[24]但人们也注意到了A-MSCs与BM-MSCs的一些区别。在接受与BM-MSCs相同的培养条件下，A-MSCs并未向成软骨和成肌方向分化；在没有1,25二羟维生素D3的条件下，A-MSCs不表达BM-MSCs在相同情况下能表达的骨钙素；A-MSCs与BM-MSCs在一部分表面标记物上亦有不同。^[15]因此，从A-MSCs获取的成骨细胞的生物学行为或许与BM-MSCs来源的成骨细胞有所不同。

3.3 骨膜

早在1962年，人们就发现骨膜外层细胞能分化成成骨细胞。^[26]骨膜作为骨形成细胞的来源，被用于两个方面——骨膜组织移植和分离骨膜来源的MSCs（P-MSCs, periosteum derived MSCs）。骨膜移植能够修复受损的兔下颌关节头^[27]和大鼠的颧骨弓。^[28]然而，由于骨膜移植所使用的是骨膜组织，而不只是骨祖细胞，因此它与骨移植并没有什么不同。骨膜作为MSCs的来源，具有极佳的成骨能力。^[29]取自马胫骨的P-MSCs在成骨培养条件下100%地分化成了成骨细胞。人来源的P-MSCs用于骨重建亦有一些成功的报导。取自人颅骨骨膜的骨形成细胞植入裸小鼠体内六周后，所新生的组织骨钙素染色呈阳性。^[30]在另一项研究中，兔P-MSCs经体外扩增分化后植入颅骨缺损部位，形成的新骨，修复了缺损。^[31]与BM-MSCs和A-MSCs相比，对P-MSCs的研究相对较少。现在还不能肯定来自骨膜的这些骨形成细胞是否能冠名为MSCs，因为到目前为止，人们只观察到这类细胞向成骨细胞和成软骨细胞分化而未能向其它类细胞分化。分离骨膜同样会遇到与骨髓抽取类似的操作上的困难。局部麻醉是必需的，但分离的骨膜量却有限。不过，P-MSCs的高成骨能力意味着未来它们也许能在骨科学与组织工程中得以应用。

3.4 骨骼肌

临床上在骨折愈合等过程中观察的肌肉内异位骨形成的现象，^[32]提示肌肉组织可能含有骨祖细胞。肌卫星细胞已被证实具有类似于BM-MSCs的多分化潜能。这些肌卫星细胞（仅存在于骨骼肌）有成肌，成脂肪和成骨的能力。

^[33,34] Levey等^[32]取健康成体的骨骼肌, 在成骨培养条件下培养卫星细胞, 发现超过70%的细胞表达ALP和骨钙素。近期肌卫星细胞被用于基因治疗的成骨研究, 一种基因治疗的方法是使用表达骨形态发生蛋白的肌卫星细胞刺激骨生成。^[35] 尽管骨骼肌的获取也需要麻醉, 而且患者术后可能会有几周的疼痛, 但比起骨髓抽取, 其采集还是方便一些。因此, 作为骨祖细胞的来源, 骨骼肌有一定的优势。但是, 从目前的研究看, 骨骼肌来源的MSCs的成骨能力似乎不如那些从骨髓, 骨膜, 脂肪组织获得的MSCs。

3.5 成人外周血

有为数不多的研究考察了成人外周血作为MSCs来源的可能性, 但研究结果并不一致, 其中一项在乳腺癌患者外周血中检测到了MSCs。^[36] Zvaifler等^[37]对来自正常个体的100多份外周血样本进行离心分离, 在所有样本的特定淘析层中均检测到了MSCs。他们估计淘析层中仅有数量占0.3%–0.7%的细胞亚群中含有MSCs。经选择的细胞在成骨培养条件下20天后, 其中约三分之一表达ALP, 骨钙素及其它成骨细胞的表型。但是此项研究并没有提供外周血MSCs体内成骨的数据。Kuznetsov等^[38]将人外周血获取的骨形成细胞与陶粉混合并植入免疫缺陷小鼠的体内。八周后在种植部位发现了骨形成, 并运用人DNA探针在新生骨组织中检测到了人来源的骨细胞。正常人体外周血中MSCs的数量非常稀少,^[38]最近Li等^[39]报道在长骨骨折患者与骨不连接患者的外周血中MSCs数量显著增高, 与正常对照组比较, 骨折患者外周血的单个核细胞的BMP-2表达显著上升。Shirley等^[40]进一步证实在兔尺骨骨折模型中, BM-MSCs能够从远端骨髓部位经外周血循环募集到骨折断端。

然而, Lazarus等^[41]及Wexler等^[17], 未能在正常人成体外周血中发现MSCs。这可能是由于外周血中MSCs数量稀少, 正如Zvaifler等^[37]和Kuznetsov等^[38]所报道的那样, 不易被检测到; 也可能是因为所使用的培养技术不合适。外周血作为MSCs的一个可能来源, 其优点是非常明显的; 因为采血是临床最通用的技术, 这会使MSCs疗法适用于几乎所有人。问题在于, 正常外周血中MSCs的含量太少, 因而有必要在外周血MSCs的纯化扩增及募集等问题上作进一步的研究。

3.6 脐血

脐血(UCB, umbilical cord blood)目前被用于获取造血干细胞。^[43]人们猜想脐血也可能含有MSCs, 有研究支持这一猜想。Rosada等^[43]成功地从分娩时获得的脐血中培养出了MSCs。在成骨条件培养下, 这些细胞分化并表达了ALP及骨钙素, 并形成了矿化的骨基质。当UCB-MSCs被植入小鼠皮下, 与BM-MSCs相比, 它们产生了较多的基质样组织, 较少量的骨形成。研究者注意到, 比起BM-MSCs, UCB-MSCs在培养体系下生长缓慢, 前体细胞数量较少, 骨相关抗原表达较低。^[44, 45]然而, 同样存在未能从脐血中鉴别出MSCs的报导,^[17, 46]表明从脐血稳定获取MSCs尚有难度。由于成人不可能获得自体UCB-MSCs, 因而临床应用UCB-MSCs将涉及同种异体移植的问题。据报道, 造血干细胞移植不需要相近的人白细胞抗原匹配,^[47]但UCB-MSCs移植是否也是如此尚不得而知。实际上, 交叉配型和长期贮存是临床UCB-MSCs利用的两个最大不便之处。

3.7 其它来源

对于其它组织是否能作为MSCs的来源，目前有争议。在一项最近的研究中，研究者发现植入无胸腺小鼠体内的牛血管周皮细胞形成了包括骨在内的多种组织。^[48]在促进向成骨细胞分化的培养条件下，血管周皮细胞来源的MSCs表达大量的成骨细胞标记物，包括骨钙素和骨涎蛋白。早期的一些研究同样支持血管周皮细胞在体外向成骨样细胞分化，^[49, 50]这些研究中的血管周皮细胞取自视网膜血管，因此，这一来源的周皮细胞并不适合于在人体上获取。骨组织已被证明是定向骨祖细胞的来源，^[51, 52]但从体内取骨以获得骨祖细胞并不可行。最近一项研究报告，妊娠4至6月的羊水中含有比BM-MSCs更具扩增潜力的MSCs，^[53]但由于交叉配型，长期贮存，及对胎儿的潜在风险等问题，其临床应用是有限的。也有报道胎儿的血和肝含有MSCs，^[54]但它们并不可能为临床所用。最近有研究表明大鼠的脾脏是MSCs的来源，^[55]尽管这类细胞并未在体内成功生成骨基质，但在成骨条件下，培养的脾细胞表达了骨钙素，ALP和骨涎蛋白。然而，与上面提到的组织一样，脾脏作为MSCs的来源，其临床应用是十分有限的。真皮组织也已被证明含有MSCs，^[56]由于真皮取材相对便捷，来源充足，因此值得对它深入研究。

4. 结语

本章讨论了公认的和新发现的MSCs的多种组织来源，并比较了它们临床应用的有利及不利因素。（见表1）最为公认，被研究得最深入，也是最可靠的骨干细胞（skeletal stem cells）来源是骨髓。然而抽取骨髓的不便是其临床应用的显著障碍。脂肪组织和骨膜都具有可能的临床应用前景，因为前者来源丰富，采集相对方便，而后者具有很高的成骨特性。骨骼肌，脐血，血管周皮细胞，骨组织，羊水，脾脏与真皮作为MSCs的潜在来源，其重要性尚不显著。但随着进一步的研究，它们也许会显示出一定的相对优势。

在成体外周血中识别出MSCs是一项重要的发现。虽然并不是所有研究均证实MSCs存在于外周血中，并且，那些成功的实验也仅检测到极少量的MSCs，但是无创伤，无痛苦的外周血采集方式，可能会在未来彻底改变MSCs的临床应用局面。当然，这尚有赖于对有关外周血骨干细胞的分离，纯化，扩增及定向分化等技术进行深入研究。如果这些研究获得成功，那么使用MSCs进行临床治疗就可能在骨科学及许多其它的医学分支中得以广泛开展。但在目前，骨髓仍然是MSCs的首选来源。

表 1 干细胞来源概览

| 来源 | 优势 | 劣势 | 评论 |
|--------|---|---|-----------------------------|
| 骨髓 | 可靠, MSCs的数量相对较多, ^[17] 公认, 高成骨潜能。 ^[18] | 采集过程费时, 患者痛苦大, 采集量少。 | 目前临床最佳选择。 |
| 脂肪组织 | 可靠, 来源充足, 与骨髓相比, 相对容易采集。 | MSCs成骨潜力低于骨髓。 ^[14] MSCs分化能力略异于骨髓MSCs。 ^[15] | 良好的临床应用潜力。需要更多的研究。 |
| 骨膜 | 极佳的成骨能力。 ^[30] | 采集过程费时, 采集量少。 | 良好的临床应用潜力。需要更多的研究。 |
| 骨骼肌 | 来源充足。 | MSCs成骨潜能低。 ^[33, 34] 采集困难。 | 良好的临床应用潜力。 |
| 成体外周血 | 采集无创伤, 无痛苦。 | MSCs数量少, 成骨潜能低。 ^[37,38] | 值得进一步研究。如果具备可靠的技术, 将成为备选来源。 |
| 脐血 | 采集方便, 无疼痛。 | MSCs成骨潜能低, ^[43] 在培养中生长慢于骨髓MSCs。 ^[44] 分离困难。临床应用涉及同种异体移植。 | 临床应用潜力较小。 |
| 血管周皮细胞 | 无明显优势。 | 采集困难, 采集量少。 | 临床应用潜力极小。需要更多的研究。 |
| 骨组织 | 定向骨祖细胞来源。 ^[51,52] | 采集困难。 | 良好的临床应用潜力。 |
| 羊水 | 扩增潜力高于骨髓MSCs。 ^[53] | 采集可能构成对胎儿的风险。临床应用涉及同种异体移植。 | 临床应用潜力极小。 |
| 脾脏 | 无明显优势。 | 研究数量少。 ^[55] 采集困难。 | 临床应用潜力较小。 |
| 真皮 | 采集方便。 | 分离困难。研究数量少。 ^[56] | 临床应用潜力较小。 |

参考文献

1. J. E. Aubin and J. T. Triffitt, in *Principles of Bone Biology 3rd Edn*, Ed. J. P. Bilezikian, L. G. Raisz and G. A. Rodan (Academic Press, San Deigo, USA, 2002), p. 59-83.
2. B. E. Petersen, W. C. Bowen, K. D. Patrene, *et al*, *Science*, 284 (1999)..
3. E. Lagasse, H. Connors, M. Al-Dhalimy, *et al*, *Nat. Med.*, 6 (2000).
4. C. R. Bjornson, R. L. Rietze, B. A. Reynolds, M. C. Magli and A. L. Vescovi, *Science*, 283 (1999)..
5. F. Parhami, S. M. Jackson, Y. Tintut Y, *et al*, *J. Bone Miner. Res.*, 14 (1999).
6. L. M. Hoffman, A. D. Weston and T. M. Underhill, *J. Bone Joint Surg.* 85A suppl 2 (2003).
7. C. Rauch, A. C. Brunet, J. Deleule and E. Farge, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 283 (2002).
8. Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, *et al*, *Exp. Neurol.*, 164 (2000).
9. P. Bianco, M. Riminucci, S. Kuznetsov and P. G. Robey, *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.*, 9 (1999).
10. A. Yamaguchi, K. Toshihisa and S. Tatsuo, *Endocr. Rev.*, 21 (2000).
11. T. Komori, H. Yagi, S. Nomura S, *et al*, *Cell*, 89 (1997).
12. B. St-Jacques, M. Hammerschmidt and A. P. McMahon, *Genes Dev.*, 13 (1999).
13. G. S. Stein and J. B. Lian, *Endocr. Rev.*, 14 (1993).
14. M. Q. Wickham, G. R. Erickson, J. M. Gimble, T. P. Vail and F. Guilak, *Clin. Orthop.*, 412 (2003).
15. P. A. Zuk, M. Zhu, P. Ashjian P, *et al*, *Mol. Biol. Cell*, 13 (2002).
16. A. J. Friedenstein, N. W. Latzinik, A. G. Grosheva and U. F. Gorskaya, *Exp. Hematol.*, 10 (1982).
17. S. A. Wexler, C. Donaldson, P. Denning-Kendall, C. Rice, B. Bradley and J. M. Hows, *Br. J. Haematol.* 121 (2003).
18. J. J. Minguell, A. Erices A and P. Conget, *Exp. Biol. Med.*, 226 (2001).
19. G. R. Lee, J. Foerster, J. Lukens, F. Paraskevas, J. P. Greer and G. M. Rodgers, in *Wintrobe's Clinical Hematology. 10th Edn.* (Williams and Wilkins, Baltimore, USA, 1999), p 102.
20. P. Vanhelleputte, K. Nijs, M. Delforge, G. Evers and S. Vanderschueren, *J. Pain Symptom Manage.*, 26 (2003).
21. R. Cancedda, M. Mastrogiacomo, G. Bianchi, A. Derubeis, A. Muraglia and R. Quarto, *Novartis Found Symp.*, 249 (2003).
22. Osiris Inc., *Nature*, 414 (2001).
23. J. I. Huang, S. R. Beanes, M. Zhu, P. Lorenz, M. H. Hedrick and P. Benhaim, *Plast. Reconstr. Surg.*, 109 (2002).
24. H. Mizuno and H. Hyakusoku, *J. Nippon Med. Sch.*, 70 (2003).
25. J. L. Drago, J. Y. Choi, J. R. Lieberman JR, *et al*, *J. Orthop. Res.*, 21 (2003).
26. E. A. Tonna and E. P. Cronkite, *Lab Invest.*, 11 (1962).
27. T. Ueno, T. Kagawa and J. Fukunaga J, *Ann. Plast. Surg.*, 51 (2003).
28. D. Ozcelik, T. Turan, F. Kabukcuoglu, *et al*, *Arch. Facial. Plast. Surg.*, 5 (2003).
29. T. Fukumoto, J. W. Sperling, A. Sanyal, *et al.*, *Osteoarthr. Cartil.*, 11 (2003).
30. J. T. Schantz, D. W. Hutmacher, H. Chim, K. W. Ng, T. C. Lim and S. H. Teoh, *Cell Transplant*, 11 (2002).
31. A. S. Breitbart, D. A. Grande, R. Kessler, J. T. Ryaby and R. J. Fitzsimmons, *Plast. Reconstr. Surg.*, 101 (1998).
32. M. M. Levey, C. J. Joyner, A. S. Viridi AS, *et al*, *Bone* 29 (2001).
33. A. Asakura, M. Komaki and M. Rudnick, *Differentiation*, 68 (2001).
34. M. R. Wada, M. Inagawa-Ogashiwa, S. Shimizu, S. Yasumoto and H. Hashimoto, *Development*, 129 (2002).
35. D. S. Musgrave, R. Pruchnic, V. Wright, *et al*, *Bone*, 28 (2001).
36. M. Fernandez, V. Simon, G. Herrera, C. Cao, H. Del-favero and J. J. Minguell, *Bone Marrow Transplant.*, 20 (1997).
37. N. J. Zvaifler, L. Marinova-Mutafchieva, G. Adams, *et al*, *Arthritis Res.*, 2 (2000).
38. S. A. Kuznetsov, M. H. Mankani, S. Gronthos, K. Satomura, P. Bianco and P. G. Robey, *J. Cell Biol.*, 153 (2001).
39. G. Li, D. Shirley, G. Burke and D. Marsh, *J. Bone Miner. Res.*, Suppl 1 (2002), p 579.
40. D. S. L. Shirley, D. Marsh, G. Jordan and G. Li, *J. Bone Miner. Res.*, Suppl 1 (2003), p 235.
41. H. M. Lazarus, S. E. Haynesworth, S. L. Gerson and A. I. Caplan, *J. Hematother.*, 6 (1997).
42. F. Lazurier, M. Doedens, O. I. Gan and J. E. Dick, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 996 (2003).
43. C. Rosada, J. Justesen, D. Melsvik, P. Ebbesen and M. Kassem, *Calcif. Tissue Int.*, 72 (2003).
44. H. S. Goodwin, A. R. Bicknese, S. N. Chien, B. D. Bogucki, C. O. Quinn and D. A. Wall, *Biol. Blood Marrow Transplant*, 11 (2001).
45. O. K. Lee, T. K. Kuo, W. M. Chen, K. D. Lee, S. L. Hsieh and T. H. Chen, *Blood*, 102 (2003).
46. K. Mareschi, E. Biasin, W. Piacibello, M. Aglietta, E. Madon and F. Fagioli, *Haematologica*, 86 (2001).
47. E. Gluckman, *Curr. Opin. Hematol.*, 2 (1995).

48. M. J. Doherty, B. A. Ashton, S. Walsh, J. N. Beresford, M. E. Grant and A. E. Canfield, *J. Bone Miner. Res.*, 13 (1998).
49. M. J. Doherty and A. E. Canfield, *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.*, 9 (1999).
50. L. Diaz-Flores, R. Getierrez, A. Lopez-Alonso, R. Gonzalez and H. Varela, *Clin. Orthop. Rel. Res.*, 275 (1992).
51. M. E. Nuttall, A. J. Patton, D. L. Olivera, D. P. Nadeau and M. Gowen, *J. Bone Miner. Res.*, 13 (1998).
52. R. Tuli, M. R. Seghatoleslami, S. Tuli, *et al*, *Mol. Biotechnol.*, 23 (2003).
53. P. S. Anker, S. A. Scherjon, C. K. van der Keur, *et al*. *Blood*, 102 (2003).
54. C. Campagnoli, I. A. Roberts, S. Kumar, P. R. Bennett, I. Bellantuono and N. M. Fisk, *Blood*, 98 (2001).
55. A. R. Derubeis, M. Mastrogiacomo, R. Cancedda and R. Quarto, *Eur. J. Cell Biol.*, 84 (2003).
56. L. Lecoecur and J. P. Ouhayoun, *Biomaterials*, 18 (1997).