

骨髓间充质干细胞向纤维软骨细胞表型的诱导分化*★

蔡贵泉, 崔一民, 陈晓东

Differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into fibrochondrocyte phenotype

Cai Gui-quan, Cui Yi-min, Chen Xiao-dong

Department of
Orthopaedics, Xinhua
Hospital Affiliated to
Shanghai Jiao Tong
University School of
Medicine, Shanghai
200092, China

Cai Gui-quan★,
Studying for master's
degree, Department
of Orthopaedics,
Xinhua Hospital
Affiliated to Shanghai
Jiao Tong University
School of Medicine,
Shanghai 200092,
China
caiguquan99@sina.
com

Correspondence to:
Chen Xiao-dong,
Doctor, Professor,
Doctoral supervisor,
Department of
Orthopaedics, Xinhua
Hospital Affiliated to
Shanghai Jiao Tong
University School of
Medicine, Shanghai
200092, China
chenxmd@163.com

Supported by:
Scientific Research
Innovation Project of
Shanghai Education
Committee,
No.08YZ37*

Received: 2009-07-11
Accepted: 2009-08-14

Abstract

BACKGROUND: The meniscus has limited ability in repairing itself after being injured. However, tissue engineering provides a new way to meniscus repair after injury. Bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs), which possess the potential of multi-directional differentiations, can be ideal seed cells in meniscus tissue engineering.

OBJECTIVE: To investigate the feasibility of differentiation of *in vitro* cultured porcine BMSCs into fibrochondrocyte phenotypes in inductive medium.

METHODS: BMSCs were isolated with whole bone marrow culture method. Then, BMSCs of the third passage were digested and incubated in a medium containing transforming growth factor- β 1, insulin-like growth factor- I, dexamethasone and ascorbic acid in a 24-well plate at a density of $2.0 \times 10^4/\text{cm}^2$ in the experimental group. While in the control group, the DMEM-LG complete culture medium containing no inductive factor were used instead. At day 7, 14 and 21 after induction respectively, Toluidine blue staining and immunocytochemical staining were performed to detect differentiation.

MAIN OUTCOME MEASURES: ①Population double time (PDT) of BMSCs; ②Morphological changes of BMSCs under light microscope; ③Proteoglycan expression; ④Collagen type I and type II expression.

RESULTS AND CONCLUSION: ①The PDT of the second passage BMSCs was 2 days, which was the shortest. The PDT prolonged relatively after the fourth passage, which were 5 to 9 days. ②The BMSCs changed from a spindle-like appearance into a polygonal shape after induction. ③In the experimental group, toluidine blue staining resulted in hyacinthine-stained cytoplasm and the blue was even deeper in the area where cells were dense; The degree of staining increased with the increasing induction time. While in the control group, only nucleus of BMSCs were stained blue. ④Collagen type I immunocytochemical staining was positive in both the experimental and the control group and there was no difference of significance between various induction time. No collagen type II was seen expressed in the control group, while in the experimental group it was seen to be expressed steadily after 14 days of induction. It is indicated that BMSCs can be induced to synthesize fibrochondrocyte-characterized extracellular matrixes *in vitro*, which suggests that BMSCs are available as seed cells in meniscus tissue engineering.

Cai GQ, Cui YM, Chen XD. Differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into fibrochondrocyte phenotype. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(2): 218-222. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 半月板损伤后自行修复能力有限, 组织工程技术为半月板损伤后修复开辟了一条新的途径。骨髓间充质干细胞具有多向分化潜能, 有可能成为半月板组织工程理想的种子细胞。

目的: 观察体外培养的猪骨髓间充质干细胞在诱导培养液作用下向纤维软骨细胞表型分化的可行性。

方法: 采用全骨髓培养法分离培养猪骨髓间充质干细胞。取第3代的骨髓间充质干细胞, 实验组以 $2.0 \times 10^4/\text{cm}^2$ 细胞密度接种于24孔板, 在含有转化生长因子 β 1、胰岛素样生长因子I、地塞米松及抗坏血酸的DMEM-LG完全培养液中诱导分化, 对照组以 $2.0 \times 10^4/\text{cm}^2$ 细胞密度接种于24孔板, 加入不含诱导因子的DMEM-LG完全培养液。在诱导第7, 14, 21天分别行甲苯胺蓝染色、免疫细胞化学染色检测其分化结果。

结果与结论: ①第2代骨髓间充质干细胞的群体倍增时间最短约为2 d, 第4代以后相对延长, 为5~9 d。②诱导后的骨髓间充质干细胞由梭形向多角形、多边形转变。③实验组可见胞浆呈明显的紫蓝色, 尤其细胞密集生长的区域蓝染较深, 染色强度随诱导时间延长而增强。对照组的骨髓间充质干细胞只有核蓝染。④实验组和对照组I型胶原免疫细胞化学染色均阳性, 各期染色无明显差异。对照组未见II型胶原表达, 实验组诱导14 d后可见II型胶原能稳定的表达。提示骨髓间充质干细胞在体外诱导培养下可分泌纤维软骨细胞特征性细胞外基质, 作为半月板组织工程种子细胞来源可行。

关键词: 骨髓间充质干细胞; 纤维软骨细胞; 诱导; 分化; 软骨组织工程

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.02.007

蔡贵泉, 崔一民, 陈晓东. 骨髓间充质干细胞向纤维软骨细胞表型的诱导分化[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(2):218-222. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

人膝关节半月板损伤是骨科的常见病,随着对半月板功能及半月板切除后并发症认识的不断深入,人们意识到修复和保留半月板功能的重要性^[1-2]。组织工程技术使修复甚至再造半月板成为可能。组织工程化半月板的重要条件之一是必须获得大量的有功能和活力的纤维软骨细胞,而骨髓间充质干细胞是存在于骨髓内的一种具有多向分化潜能的成体干细胞,可在体外大量培养扩增,有可能成为组织工程较为理想的种子细胞来源。实验旨在建立一种骨髓间充质干细胞向纤维软骨细胞表型分化的体外培养体系,对体外诱导培养不同时期的骨髓间充质干细胞进行连续鉴定,从而为骨髓间充质干细胞作为半月板组织工程的种子细胞来源提供理论和实验依据。

1 材料和方法

设计: 成组设计,细胞形态学,免疫细胞化学实验。

时间与地点: 实验于2008-05/2009-03在上海交通大学医学院附属新华医院科研中心完成。

材料:

实验动物: 45 d龄长枫杂交猪5只,体重6~8 kg,雌雄不限,由上海市南汇县老港镇特种养殖场提供。实验过程中对动物的处置符合动物伦理学标准^[3]。

主要试剂:

试剂	来源
DMEM 培养液及 0.25% 胰蛋白酶+0.02% EDTA	美国 GIBCO 公司
转化生长因子 β 1、胰岛素样生长因子 I	美国 PERPOTTECH 公司
地塞米松及抗坏血酸	美国 SIGMA 公司
胎牛血清	澳大利亚 PAA
鼠抗人 I 型胶原抗体	美国 Abcam 公司
鼠抗人 II 型胶原抗体	美国 NeoMarkers 公司
辣根过氧化物酶标记第二抗体及 DAB 显示剂	美国 Dako 公司

实验方法:

取材: 实验动物以氯胺酮(2 mg/kg)、0.25%戊巴比妥钠(0.2 mL/kg)肌肉注射麻醉,以骨髓穿刺针垂直穿刺入髌骨骨髓腔,抽取骨髓6~8 mL,立即注入含 30 mL 肝素化无血清 DMEM-LG 培养液至 50 mL 无菌离心管中,混匀

制成细胞悬液。

骨髓间充质干细胞的分离培养及扩增: 参照全骨髓培养法^[4-5],将细胞悬液以 1 500 r/min 离心 8 min,弃上清液,以 PBS 清洗 3 次,去除上层脂肪及组织液,下层即为含骨髓间充质干细胞的有核细胞层。加入 DMEM-LG 完全培养液(含体积分数 10% 胎牛血清、L-谷氨酰胺 300 mg/L、抗坏血酸 50 mg/L、青霉素 100 U/mL、链霉素 100 mg/L),计数有核细胞,以 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 有核细胞接种入直径 100 mm 培养皿,置于 37 °C、体积分数为 5% CO₂、100% 饱和湿度培养箱中培养。培养的第 5 天进行首次换液,吸除悬浮有大量红细胞的培养液, PBS 洗涤 3 次后加入新鲜培养液,继续培养,每周换液 2 次, OLMPUS 倒置相差显微镜逐日观察细胞形态及生长情况。待细胞生长融合达 80%~90% 时,用 0.25% 胰蛋白酶+0.02% EDTA 消化,传代,按 $1.5 \times 10^4/\text{cm}^2$ 细胞密度接种传代扩增。

群体倍增时间(population double time, PDT)测定: 将各代细胞按 1×10^5 /孔接种到 6 孔板上,待细胞融合达 80%~90% 时,用 0.25% 胰蛋白酶+0.02% EDTA 消化、计数,按公式 $(T-T_0) \times \ln 2 / (\ln N - \ln N_0)$ 可得到各代细胞的群体倍增时间。以 $1/\ln \text{PDT}$ 代表细胞增殖速度,绘制趋势图。其中 T_0 为初始接种时间, T 为中止消化时间, N_0 为初始接种细胞数, N 为中止消化时细胞数。

骨髓间充质干细胞的诱导分化: 取第 3 代细胞分为 2 组,实验组以 $2.0 \times 10^4/\text{cm}^2$ 细胞密度接种于 24 孔板,分别加入 1 mL DMEM-HG 完全诱导培养液(含体积分数 10% 胎牛血清、转化生长因子 β 1 10 $\mu\text{g/L}$ 、胰岛素样生长因子 I 50 $\mu\text{g/L}$ 、地塞米松 40 $\mu\text{g/L}$ 、L-谷氨酰胺 300 mg/L、抗坏血酸 50 mg/L、青霉素 100 U/mL、链霉素 100 mg/L);对照组以 $2.0 \times 10^4/\text{cm}^2$ 细胞密度接种于 24 孔板,分别加入 1 mL DMEM-LG 完全培养液,内置爬片,置于 37 °C、体积分数为 5% CO₂、100% 饱和湿度培养箱中培养,每周换液 2 次,分别在诱导后第 7, 14, 21 天取出爬片,行蛋白多糖甲苯胺蓝染色和免疫细胞化学染色。

甲苯胺蓝染色: 实验组和对照组分别在诱导培养第 7, 14, 21 天取出爬片,丙酮固定 5 min, PBS 冲洗, 1% 甲苯胺蓝室温染色 30 min,洗去多余的染液,梯度脱水,透明,中性树胶封固。

免疫细胞化学染色: 实验组和对照组分别在诱导和培养第 7, 14, 21 天取出爬片,丙酮固定 5 min, PBS 洗 3 次, 0.25% Triton X-100 通透 10 min, PBS 洗 3 次,体积分数为 3% H₂O₂ 封闭

上海交通大学医学院附属新华医院骨科,上海市 200092

蔡贵泉★,男,1981 年生,广东省汕头市人,汉族,上海交通大学医学院附属新华医院骨科在读硕士,主要从事半月板组织工程的研究。
caiguquan99@sina.com

通讯作者:陈晓东,博士,教授,主任医师,博士生导师,上海交通大学医学院附属新华医院骨科,上海市 200092
chenxdmd@163.com

中图分类号:R318
文献标识码:A
文章编号:1673-8225
(2010)02-00218-05

收稿日期:2009-07-11
修回日期:2009-08-14
(20090611015/M·J)

内源性过氧化物酶15 min, PBS洗3次, 体积分数10%非免疫羊血清30 min, 后弃去非免疫血清, 加入0.5%牛血清白蛋白稀释的1:50鼠抗人I型胶原抗体/鼠抗人II型胶原抗体, 置湿盒4℃过夜, PBS洗3次, 加辣根过氧化物酶标记二抗, 37℃孵育30 min, PBS洗3次, DAB显色5 min, 苏木精复染, 梯度脱水, 透明, 中性树脂封固。以不加一抗样本作为空白对照, 正常猪半月板纤维软骨免疫组化作阳性对照。

主要观察指标: ①骨髓间充质干细胞的群体倍增时间。②诱导分化后的光镜形态变化。③甲苯胺蓝染色检测蛋白多糖表达。④免疫细胞化学染色检测I型胶原和II型胶原表达。

设计、实施、评估者: 实验设计、实施由第一作者完成, 结果评估为第二、三作者完成。

统计学分析: 由第一作者采用SPSS 11.5统计软件分析处理, 检测数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 实验组和对照组的阳性率比较采用成组设计的两样本均数比较 t 检验, 实验组内不同诱导时间阳性率比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 则认为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 倒置相差显微镜观察结果 原代细胞培养5 d后首次换液, 即可看到贴壁的细胞小克隆, 细胞形态呈较一致的长梭形、纺锤形, 细胞较小, 呈克隆性生长(图1)。



Figure 1 The spindle-like, adherently growing primary cells cultured for 5 days (inverted phase contrast microscope, $\times 100$)

图1 原代细胞培养5 d, 呈长梭形贴壁生长(倒置相差显微镜, $\times 100$)

随培养时间的延长, 悬浮细胞逐渐坏死破碎, 随换液次数增多而被清除。细胞克隆不断扩大, 呈放射状向周围扩展, 逐渐与邻近克隆汇合, 10~14 d可达到80%~90%的融合, 细胞排列呈螺旋状或漩涡状。传代细胞接种2~4 h后, 开始附壁铺伸, 24 h后已基本完成贴壁, 48~72 h开始快速增殖, 4~7 d时可达80%~90%的融合。传代细胞与原代相比, 生长较快, 细胞均一性更好, 呈长梭形。诱导因子加入后, 细胞的增殖速度明显低于对照组, 细胞形态由梭形向多角形、多边形转变, 有明显的聚集生长现象, 有些密集区可形成结节。

2.2 群体倍增时间 第1~10代细胞的增殖情况及换算得到的PDT值见表1。

表1 第1~10代细胞的增殖情况和群体倍增时间
Table 1 The proliferative activity and population double time (PDT) of cells from Passage 1 (P_1) to P_{10}

Cell passage	Inoculum size ($\times 10^6$)	Culture time (h)	Fusion size ($\times 10^6$)	PDT (h)
P_1	1.00	119	3.18	71.40
P_2	1.00	115	5.60	46.27
P_3	1.00	167	4.00	83.50
P_4	1.00	222	2.55	164.38
P_5	1.00	145	2.10	135.46
P_6	1.00	190	2.30	158.12
P_7	1.00	219	2.40	173.39
P_8	1.00	210	2.10	196.19
P_9	1.00	220	2.15	199.21
P_{10}	1.00	218	2.35	176.85

以 $1/\ln \text{PDT}$ 代表细胞的增殖速度, 可得到各代细胞增殖速度趋势图(图2)。

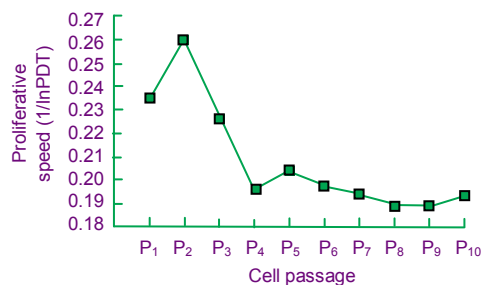


Figure 2 Tendency graph of proliferative speed for bone marrow mesenchymal stem cells undergoing *in vitro* monolayer culture

图2 体外单层培养骨髓间充质干细胞的增殖速度趋势图

由表1及图2可见, 第2代的PDT最短, 第4代以后PDT相对延长, 但第4~10代细胞的PDT差异不显著。按此推算, 第1~3代共约17 d, 细胞可扩增到71.2倍, 以满足一般半月板缺损的组织工程修复的要求。

2.3 蛋白多糖甲苯胺蓝染色 实验组诱导后可见胞浆呈明显的紫蓝色, 尤其细胞密集生长的区域蓝染较深, 染色强度随诱导时间延长而增强(图3)。对照组的骨髓间充质干细胞只有核蓝染。

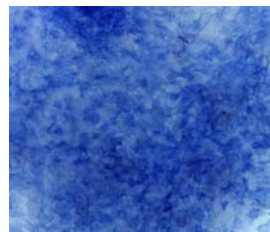


Figure 3 The dark blue cytoplasm of bone marrow mesenchymal stem cells induced for 21 days, toluidine blue staining ($\times 200$)

图3 实验组细胞诱导21 d, 甲苯胺蓝染色细胞胞浆呈深蓝色($\times 200$)

2.4 I 型胶原和 II 型胶原免疫细胞化学染色

I 型胶原免疫细胞化学染色显示:

实验组诱导 7, 14, 21 d 的骨髓间充质干细胞胞浆均呈现明显的棕褐色, 各期染色无明显差异(图 4)。

对照组亦为阳性(图 5)。

II 型胶原免疫细胞化学染色显示:

实验组诱导 7 d 的骨髓间充质干细胞在细胞密集处, 个别细胞胞浆中呈明显棕褐色, 大部分细胞胞浆呈不明显黄棕色(图 6); 诱导 14 d 的骨髓间充质干细胞呈现广泛的棕褐色染色, 在细胞密集处染色更深(图 7); 诱导 21 d 的骨髓间充质干细胞同诱导 14 d 的骨髓间充质干细胞。

对照组骨髓间充质干细胞未见棕褐色颗粒。

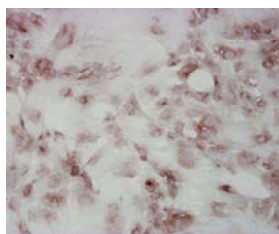


Figure 4 Cells in the experimental group showed positive result to collagen type I immunocytochemical staining after being induced for 21 days ($\times 200$)

图 4 实验组细胞诱导 21 d, I 型胶原免疫细胞化学染色阳性($\times 200$)

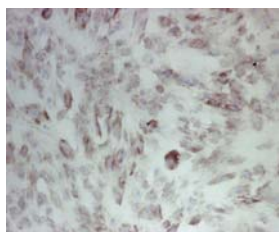


Figure 5 Cells in the control group showed positive result to collagen type I immunocytochemical staining ($\times 200$)

图 5 对照组细胞 I 型胶原免疫细胞化学染色阳性($\times 200$)

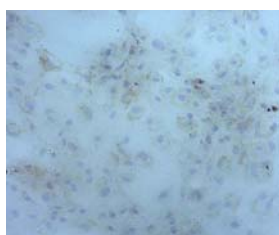


Figure 6 Cells in the experimental group showed weakly positive result to collagen type II immunocytochemical staining after being induced for 7 days ($\times 200$)

图 6 实验组细胞诱导 7 d, II 型胶原免疫细胞化学染色弱阳性($\times 200$)

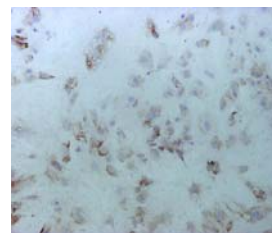


Figure 7 Cells in the experimental group showed positive result to collagen type II immunocytochemical staining after being induced for 14 days ($\times 200$)

图 7 实验组细胞诱导 14 d, II 型胶原免疫细胞化学染色阳性($\times 200$)

2.5 不同诱导时间 II 型胶原免疫细胞化学染色阳性率的比较 见表 2。

表 2 不同诱导时间 II 型胶原免疫细胞化学染色阳性率的比较
Table 2 Comparison of collagen type II positive cells ratio in different times ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$, %)

Group	7 d	14 d	21 d
Experimental	32.91 $\pm$ 6.22 ^a	89.20 $\pm$ 4.43 ^{ab}	87.70 $\pm$ 4.85 ^{ab}
Control	1.23 $\pm$ 0.31	1.17 $\pm$ 0.17	1.18 $\pm$ 0.18

^a $P < 0.01$, vs. control group; ^b $P < 0.01$, vs. day 7

3 讨论

种子细胞来源是半月板组织工程的首要问题。半月板纤维软骨细胞来源有限, 体外扩增时间长, 且随年龄增大糖氨聚糖和胶原合成能力明显下降^[6], 限制了半月板纤维软骨细胞在临床上的使用。间充质干细胞广泛存在于骨髓、骨膜和软骨膜中, 它繁殖能力强, 体外培养达 30 代以上, 细胞数目扩增 100 万倍以上仍保持良好的多分化潜能^[7]。骨髓间充质干细胞以其来源充足、取材方便、创伤小、增殖能力强、无排斥反应、不存在伦理问题、易于多种载体基因转导等优点^[8], 被公认为有可能成为软骨组织工程理想的种子细胞来源。Yamasaki 等^[9]使用同种异体鼠半月板支架, 接种入鼠骨髓间充质干细胞后体外培养 4 周, 然后移植入体内缺损处, 术后 4 周和 8 周荧光显微镜可以检测到移植半月板内有骨髓间充质干细胞存活, 甲苯胺蓝和番红-O 染色可以显示糖氨聚糖合成, 且随时间增多。但该实验未对胶原合成进行检测。本实验的目的是在体外单层培养条件下, 使骨髓间充质干细胞向纤维软骨细胞表型诱导分化。

本实验应用高糖 DMEM 培养基对骨髓间充质干细胞分化为软骨细胞具有明显的促进作用。因为软骨细胞和骨髓间充质干细胞在体外单纯培养中会逐渐凋亡, 高糖培养基可改变细胞新陈代谢, 从而降低对凋亡的敏感性, 有利于骨髓间充质干细胞存活^[7]。本实验将转化生长因子 $\beta 1$ 、胰岛素样生长因子 I、地塞米松、抗坏血酸联合使用, 力求获得较大的促增殖效应和软骨诱导效应。转化

生长因子 β 系列生长因子是一族具有多种功能的多肽,它能够促进细胞增殖,调节细胞分化,促进细胞合成并分泌细胞外基质^[10]。转化生长因子 $\beta 1$ 的信号通过smad途径传导入核,激活sox9。sox9是一类转录调控因子,它能促进细胞中II型胶原基因的表达,最终促进II型胶原的分泌^[11-12]。胰岛素样生长因子I是一种强有力的合成代谢刺激因子,能显著促进有丝分裂,可促进软骨细胞增殖和成熟,合成软骨基质蛋白多糖,且可促进骨髓间充质干细胞向软骨细胞分化,有利于软骨的生长。其与转化生长因子 $\beta 1$ 协同在早期促进骨髓间充质干细胞增殖和分化更加明显^[13]。培养基中加入地塞米松亦有协同促进骨髓间充质干细胞向软骨细胞分化的作用^[14]。抗坏血酸是一种抗氧化剂,可抑制或减少凋亡的产生。

国内外许多研究亦使用转化生长因子 $\beta 1$ 等诱导骨髓间充质干细胞向软骨细胞分化,但诱导成透明软骨细胞还是纤维软骨细胞尚无定论。纤维软骨细胞以合成I型胶原、II型胶原和蛋白多糖为特征,其中I型胶原为纤维软骨所独有^[15]。本实验证实,在该实验培养体系下,实验组骨髓间充质干细胞经诱导后仍能持续表达I型胶原;II型胶原在诱导前不表达,诱导14 d后能稳定的表达;蛋白多糖经诱导后表达增加,提示骨髓间充质干细胞经诱导后能同时表达I型胶原、II型胶原及蛋白多糖,即有向着纤维软骨细胞表型方向分化的可行性。本实验仅从免疫组化方面定性鉴定细胞诱导分化情况,诱导后I型胶原虽然能持续表达,但其表达量是否有明显改变仍不清楚,有必要通过蛋白电泳或聚合酶链反应等进行定量检测。

半月板是一个异质体,I型胶原和II型胶原在半月板内部和外部的含量不同^[16]。同时体外单层培养环境不如体内环境复杂,体内半月板纤维软骨细胞之间、细胞与基质之间存在着复杂的调控机制,且半月板处于应力环境中^[17],其各部位的纤维软骨细胞所承受的应力也不同。人们已经观察到对软骨细胞施加应力刺激,不仅可以维持细胞表型,还可以促进细胞的合成与增殖,甚至改变细胞的组织结构^[18-19]。因此,压应力对诱导后细胞表型的维持,以及不同诱导因素的组合对细胞外基质合成的影响有待进一步研究。且本实验仅从细胞学水平验证骨髓间充质干细胞向纤维软骨细胞表型分化,有必要从分子生物学水平进一步探索骨髓间充质干细胞诱导成纤维软骨细胞的信号传导和分化机制,以及诱导后的纤维软骨细胞表型如何长期维持,从而为半月板组织工程提供更多的实验基础。

4 参考文献

- [1] McKinley TO, English DK, Bay BK. Trabecular bone strain changes resulting from partial and complete meniscectomy. Clin Orthop Relat Res. 2003;(407):259-267.

- [2] Alford JW, Lewis P, Kang RW, et al. Rapid progression of chondral disease in the lateral compartment of the knee following meniscectomy. Arthroscopy. 2005;21(12):1505-1509.
- [3] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals. 2006-09-30. 中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30.
- [4] Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. Cell Tissue Kinet. 1987;20(3):263-272.
- [5] Zhou G, Liu W, Cui L, et al. Repair of porcine articular osteochondral defects in non-weightbearing areas with autologous bone marrow stromal cells. Tissue Eng. 2006;12(11):3209-3221.
- [6] Verbruggen G, Cornelissen M, Almqvist KF, et al. Influence of aging on the synthesis and morphology of the aggrecans synthesized by differentiated human articular chondrocytes. Osteoarthritis Cartilage. 2000;8(3):170-179.
- [7] Johnstone B, Hering TM, Caplan AL, et al. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. Exp Cell Res. 1998;238(1):265-272.
- [8] Izuta Y, Ochi M, Adachi N, et al. Meniscal repair using bone marrow-derived mesenchymal stem cells: experimental study using green fluorescent protein transgenic rats. Knee. 2005;12(3):217-223.
- [9] Yamasaki T, Deie M, Shinomiya R, et al. Transplantation of meniscus regenerated by tissue engineering with a scaffold derived from a rat meniscus and mesenchymal stromal cells derived from rat bone marrow. Artif Organs. 2008;32(7):519-524.
- [10] Worster AA, Nixon AJ, Brower-Toland BD, et al. Effect of transforming growth factor beta 1 on chondrogenic differentiation of cultured equine mesenchymal stem cells. Am J Vet Res. 2000;61(9):1003-1010.
- [11] Attisano L, Wrana JL. Signal transduction by the TGF-beta superfamily. Science. 2002;296(5573):1646-1647.
- [12] Kawamura K, Chu CR, Sobajima S, et al. Adenoviral-mediated transfer of TGF-beta1 but not IGF-1 induces chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in pellet cultures. Exp Hematol. 2005;33(8):865-872.
- [13] Fukumoto T, Sperling JW, Sanyal A, et al. Combined effects of insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta1 on periosteal mesenchymal cells during chondrogenesis in vitro. Osteoarthritis Cartilage. 2003;11(1):55-64.
- [14] Stewart AA, Byron CR, Ponden HC, et al. Effect of dexamethasone supplementation on chondrogenesis of equine mesenchymal stem cells. Am J Vet Res. 2008;69(8):1013-1021.
- [15] Detamore MS, Athanasiou KA. Motivation, characterization, and strategy for tissue engineering the temporomandibular joint disc. Tissue Eng. 2003;9(6):1065-1087.
- [16] Cheung HS. Distribution of type I, II, III and V in the pepsin solubilized collagens in bovine menisci. Connect Tissue Res. 1987;16(4):343-356.
- [17] Sweigart MA, Athanasiou KA. Tensile and compressive properties of the medial rabbit meniscus. Proc Inst Mech Eng H. 2005;219(5):337-347.
- [18] Wang G, Liu Y, Shan YX, et al. Zhongguo Xuefu Chongjian Waikexue. 2004;18(2):96-99.
- [19] Angele P, Yoo JU, Smith C, et al. Cyclic hydrostatic pressure enhances the chondrogenic phenotype of human mesenchymal progenitor cells differentiated in vitro. J Orthop Res. 2003;21(3):451-457.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 上海市教育委员会科研创新项目(08YZ37)。

课题价值: 课题得到上海市教育委员会科研创新项目(08YZ37)“压应力对构建半月板代谢及生物力学的影响”资助,旨在将猪骨髓间充质干细胞进行体外诱导培养,复合同种异体脱钙骨基质,研究不同条件的循环压应力对于组织工程半月板结构、力学特性及其代谢的影响,从而为组织工程半月板的临床应用打下基础。

同行评价: 论文选题结合临床紧密,试图解决临床中的实际问题,设计合理,文字通顺,结果较可信。

偏倚或不足: 实验方法主要是细胞培养、免疫组化,相对单一,若加上蛋白电泳等定量检测实验指标,则更有说服力。