

转化生长因子 β 1联合骨形态发生蛋白2诱导骨髓间充质干细胞体外向软骨细胞的分化*

张清林, 吕惠成, 吴一民

In vitro differentiation from bone marrow mesenchymal stem cells into chondrocytes induced by transforming growth factor-beta combined with bone morphogenetic protein-2

Zhang Qing-lin, Lü Hui-cheng, Wu Yi-min

Abstract

BACKGROUND: Multiple studies have reported that transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) induced differentiation from bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) into chondrocytes; however, reports addressing bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) inducing the differentiation remain less.

OBJECTIVE: To verify the possibility and interaction of differentiation from BMSCs into chondrocytes induced by TGF- β 1 and BMP-2.

METHODS: BMSCs were derived from healthy Wistar rats using adherent methods. The BMSCs were assigned into four groups: TGF- β 1+BMP-2, TGF- β 1, BMP-2, and control groups. At 14 days after induction, alcian blue staining and dimethyl-methylene blue chromatometry were employed to determine the glycosaminoglycan (GAG) level, and immuno-histochemistry was used to detect the expression of specific type II collagen.

RESULTS AND CONCLUSION: In the three experimental groups, alcian blue staining and type II collagen immunohistochemistry examinations showed that chondrocytes could express glycosaminoglycan (GAG) and type II collagen, and the GAG detection showed that the expression of GAG gene was significantly greater in the TGF- β 1+BMP-2 group than in the TGF- β 1 group and BMP-2 group ($P < 0.05$). TGF- β 1 combined with BMP-2 was more effective for promoting the differentiation from BMSCs into chondrocytes, which might be used as the better source of the seed cells of cartilage tissue engineering.

Second Department of Orthopedics, Second Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical College, Huhehaote 010030, Inner Mongolia Autonomous Region, China

Zhang Qing-lin★, Studying for master's degree, Second Department of Orthopedics, Second Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical College, Huhehaote 010030, Inner Mongolia Autonomous Region, China
linzi688@163.com

Zhang QL, Lü HC, Wu YM. *In vitro* differentiation from bone marrow mesenchymal stem cells into chondrocytes induced by transforming growth factor-beta combined with bone morphogenetic protein-2. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(24):4371-4375. [http://www.crter.cn http://en.zgckf.com]

Correspondence to: Wu Yi-min, Doctor, Chief physician, Professor, Second Department of Orthopedics, Second Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical College, Huhehaote 010030, Inner Mongolia Autonomous Region, China

Received: 2010-01-10
Accepted: 2010-03-01

摘要

背景: 国内外许多学者成功利用转化生长因子 β 1诱导骨髓间充质干细胞向软骨细胞分化报道较多,而对骨形态发生蛋白2作为诱导因子诱导骨髓间充质干细胞向软骨细胞分化的报道较少。

目的: 观察验证转化生长因子 β 1和骨形态发生蛋白2诱导骨髓间充质干细胞下向软骨细胞表型转化的可能性及相互作用。

方法: 取健康Wistar大鼠骨髓,采用贴壁法筛选获得骨髓间充质干细胞。按添加生长因子的不同分为4组:转化生长因子 β 1+骨形态发生蛋白2组,转化生长因子 β 1组,骨形态发生蛋白2组,对照组不添加任何生长因子。于诱导14 d后,分别进行阿利新蓝染色和二甲基亚甲蓝比色法定性定量检测糖胺聚糖的分泌表达,免疫组织化学法检测软骨特异性II型胶原的表达。

结果与结论: 3个加入细胞因子的实验组在阿利新蓝染色和软骨特异性II型胶原免疫组化检测中均有不同程度的阳性表达,糖胺聚糖的定量检测中,转化生长因子 β 1+骨形态发生蛋白2联合应用组的糖胺聚糖含量明显高于其他组($P < 0.05$)。结果提示转化生长因子 β 1、骨形态发生蛋白2联合作用更能促进骨髓间充质干细胞向软骨细胞诱导分化,分泌软骨特异性基质,有可能成为软骨组织工程较理想的种子细胞来源。

关键词: 骨髓间充质干细胞; 软骨细胞; 转化生长因子 β 1; 骨形态发生蛋白2; 软骨组织工程

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.24.001

张清林, 吕惠成, 吴一民. 转化生长因子 β 1联合骨形态发生蛋白2诱导骨髓间充质干细胞体外向软骨细胞的分化[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(24):4371-4375. [http://www.crter.org http://cn.zgckf.com]

0 引言

目前,常用于修复软骨损伤的种子细胞多为自身软骨细胞,由于软骨细胞属于增殖能力极弱的终末未分化细胞,缺乏再生能力,因此自体软骨细胞来源困难是束缚软骨细胞移植和软骨工程学发展的主要问题之一^[1]。

骨髓间充质干细胞(bone marrow-derived

mesenchymal stem cell, BMSC)在不同诱导条件下具有向成软骨细胞、成骨细胞、神经细胞等分化的潜能。与软骨细胞相比其来源不受限,取材方便,对供体损伤小,易于分离培养及体外增殖能力强,已成为软骨组织工程研究的热点^[2-4]。BMSCs在体外的定向分化受多种因素限制,其中细胞生长因子的作用,以及细胞局部微环境均是影响BMSCs向软骨方向分化的重要因素^[5]。实验以转化生长因子 β 1(transforming

内蒙古医学院第二附属医院骨科创伤2科, 内蒙古自治区呼和浩特市 010030

张清林★, 男, 1984年生, 山东省济宁市人, 内蒙古医学院在读硕士, 主要从事骨髓间充质干细胞与骨折愈合的研究。
linzi688@163.com

通讯作者: 吴一民, 博士, 主任医师, 教授, 内蒙古医学院第二附属医院骨科创伤2科, 内蒙古自治区呼和浩特市 010030

中图分类号: R318
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225 (2010)24-04371-05

收稿日期: 2010-01-10
修回日期: 2010-03-01
(20090801036/W·H)

growth factor betal, TGF-β1)、骨形态发生蛋白2 (bone morphogenetic protein-2, BMP-2)作为BMSCs向软骨细胞诱导分化的主要诱导因子, 比较单独及联合应用时, 对诱导细胞II型胶原表达以及糖胺聚糖表达量的影响, 探讨其在诱导细胞分化过程中的相互作用。

1 材料和方法

设计: 对比观察, 细胞学体外实验。

时间及地点: 实验于2009-01/06在内蒙古临床医学研究中心完成。

材料: 清洁级Wistar大鼠20只, 10~12周龄, 雌雄不拘, 体质量100~150 g, 由内蒙古大学动物饲养中心提供(许可证号: SCXK(蒙)2009-0130)。实验过程中对动物处置符合2006年科学技术部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》^[6]。

试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
DMEM 培养基	Gibco-BRL 公司, 美国
地塞米松、阿利新蓝	sigma 公司, 美国
TGF-β1, BMP-2	pepprotech 公司, 美国
兔抗鼠II型胶原单克隆抗体	北京博奥森生物公司
二甲基亚甲蓝	Aldrich 公司, 美国
CO ₂ 培养箱	Heraeus 公司, 德国
酶标仪	TECAN 公司, 美国
CA950-2 超净台	上海净化仪器厂

实验方法:

BMSCs分离、培养及鉴定: 无菌条件下取小鼠股骨和肱骨, 用含体积分数为15%胎牛血清的低糖DMEM冲出骨髓, 接种于培养瓶中, 置于体积分数为5% CO₂、37℃培养箱中培养, 此为原代细胞。48 h后更换培养液, 去除未贴壁悬浮细胞。每隔48 h用含体积分数为10%胎牛血清的DMEM换液。倒置相差显微镜下观察细胞铺满瓶底约80%后即可传代。2.5 g/L胰蛋白酶溶液消化细胞, 调整细胞浓度至1×10⁸ L⁻¹, 分瓶接种, 继续培养。收集第3代的细胞, 消化后制备成细胞浓度为1×10⁹个/L的细胞悬液, 分别以荧光素标记的CD34 mAb-FITC、抗CD90 mAb-FITC对细胞行单色荧光染色(避光), 洗涤后用流式细胞术进行检测, CellQuest软件分析, 同时用免疫组织化学法对鉴定骨髓基质干细胞表面CD44的表达。

体外定向诱导成软骨细胞培养及实验分组: 将体外扩增的第3代BMSCs按1×10⁸ L⁻¹接种于置有

消毒盖玻片的6孔板内制备细胞爬片, 并行软骨细胞定向诱导, 基础诱导液为含50 μg/L地塞米松的DMEM高糖无血清培养基。按添加生长因子的不同分成3个实验组和对照组, 其中, 实验组分别为: TGF-β1 + BMP-2组(TGF-β1 10 μg/L、BMP-2 100 μg/L); TGF-β1组(TGF-β1 10 μg/L); BMP-2 (BMP-2 100 μg/L); 对照组不添加任何生长因子。每隔48 h换液1次, 诱导14 d后, 取出盖玻片, 用体积分数为95%冷丙酮固定盖玻片, 进行组织学染色。并收集各组细胞换液时的培养液, 进行糖胺聚糖含量的检测。

阿利新蓝染色: 各组于诱导14 d后取出细胞爬片, 在阿利新蓝-0.1 mol/L盐酸溶液中染色10 min, 双蒸水冲洗2 min, 梯度乙醇依次脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封固, 倒置显微镜下观察糖胺聚糖的分泌情况。

II型胶原免疫组织化学染色: 细胞爬片用预温的PBS液洗2次, 丙酮/乙醇(1:1)固定15 min, PBS漂洗3次, 体积分数3%过氧化氢孵育10 min, 以免抗鼠II型胶原多克隆抗体进行常规SP法免疫组织化学, 室温下DAB避光显色, 梯度乙醇依次脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封固, 光镜下观察爬片。

DMB(二甲基亚甲蓝)比色法测定培养液中糖胺聚糖的水平: 各组细胞诱导培养14 d后各组随机抽取10孔, 二甲基亚甲蓝比色法检测吸光度^[7-8], 通过吸光密度来检测细胞外基质糖胺聚糖的分泌情况, 从而反映加入诱导剂后BMSCs向软骨细胞分化情况。

主要观察指标: II型胶原、糖胺聚糖的分泌表达。

设计、实施、评估者: 实验设计由一、二、三作者, 实施由一、二作者, 评估为第一、三作者。作者均受过组织工程技术培训。

统计学分析: 由第一作者用SPSS 13.0统计软件处理, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组比较采用方差分析, 组间两两比较采用q检验。 $P < 0.05$ 为差异具有显著性意义。

2 结果

2.1 倒置相差显微镜观察结果 刚接种的原代BMSCs呈圆形或类圆形, 与周围的血细胞相混杂, 大小不一, 不能辨认细胞核。培养2 d首次换液后, 可见短梭形及多形性的细胞贴附在瓶底, 数量较少, 散在分布。第三四天细胞开始以集落方式生长, 数量明显增多, 见图1。



Figure 1 Bone marrow mesenchymal stem cells were in spindle-shaped colony growth at 4 d after primary culture ($\times 100$)

图1 BMSC 原代培养 4 d 细胞呈集落梭形生长($\times 100$)

随着培养时间延长, 集落逐渐增大, 八九天细胞可达90%的汇合, 无接触抑制现象, 细胞平行排列或漩涡状生长。传代后细胞很快贴壁, 增殖迅速, 呈长梭形, 散在均匀分布, 不再呈集落样生长, 两三天可达80%~90%的汇合。实验组形态逐渐由长梭形向多角形转化, 同时出现聚集生长的趋势, 见图2。

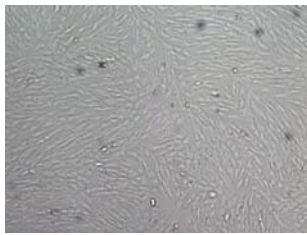


Figure 2 Cells in the experimental group were polygonal-shaped and showed aggregated growth trends at 10 d after induction ($\times 100$)

图2 实验组诱导 10 d 细胞向多角形、转化出现聚集生长的趋势 ($\times 100$)

对照组细胞基本保持长梭形, 增殖能力旺盛, 无聚集生长趋势。

2.2 BMSCs的鉴定 培养的大鼠第3代BMSCs的CD90阳性率: 95.5%, CD34阳性率: 0.21%, 符合实验要求, 见图3。

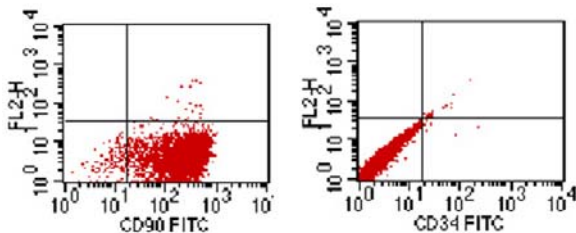


Figure 3 Flow cytometry analysis demonstrated that most of bone marrow mesenchymal stem cells expressed CD90, but a very small number of cells expressed CD34

图3 流式细胞仪检测分析 MSCs 大部分细胞表达 CD90, 极少量细胞表达 CD34

2.3 阿利辛蓝染色结果 3个添加生长因子组阿利辛蓝染色结果阳性反应, 细胞呈蓝色多角型, 细胞轮廓清晰可见, 图4a; 对照组极少量细胞呈蓝色, 图4b。

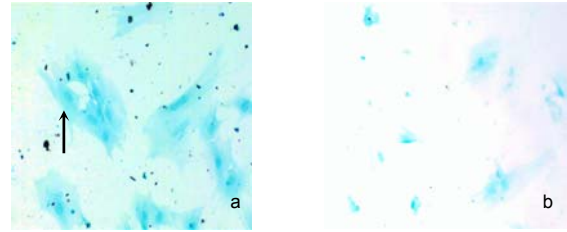


Figure 4 Alcian blue staining-positive reaction was observed in the three experimental groups (a), cells were blue (arrow), but a very small number of cells were blue in the control group (b) ($\times 100$)

图4 添加生长因子 3 个组(a)阿利辛蓝染色结果阳性反应, 细胞呈蓝色多角型(如箭头所示), 对照组(b)极少量细胞呈蓝色($\times 100$)

2.4 II型胶原免疫组织化学染色结果 诱导组细胞II型胶原免疫组织化学染色结果呈阳性反应, 细胞浆呈棕褐色, 说明诱导组表达了软骨细胞的表型II型胶原蛋白, 可证实为软骨细胞, 图5a。对照组为阴性反应, 未见棕褐色细胞, 图5b。

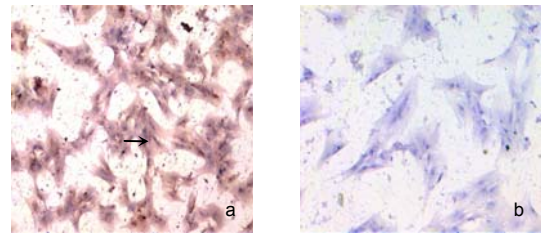


Figure 5 Type II collagen immunohistochemical staining showed positive reaction, and cytoplasm was brown (a), but the control group was negative, and no brown cells were observed (b) ($\times 100$)

图5 诱导组细胞II型胶原免疫组织化学染色结果呈阳性反应, 细胞浆呈棕褐色(a), 对照组为阴性反应, 未见棕褐色细胞(b)($\times 100$)

2.5 II型胶原免疫组织化学染色灰度值分析 MetaMorph显微图像分析系统分析4组细胞II型胶原染色灰度值分析结果, 见表1。

表1 各组细胞II型胶原染色灰度值分析结果
Table 1 Gray value analysis results of type II collagen staining in each group ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Group	Gray value
Control	5.060 1 \pm 1.002
TGF- β 1	38.286 3 \pm 2.326
BMP2	17.793 8 \pm 1.235
TGF- β 1 + BMP-2	68.536 8 \pm 5.922 ^a

^a $P < 0.05$, vs. other groups; TGF- β 1: transforming growth factor- β 1; BMP-2: bone morphogenetic protein-2

2.6 各组糖胺聚糖的定量检测结果 与对照组[(6.86±0.25) μg/孔]比较, 各实验组糖胺聚糖含量均有明显增加($P < 0.05$); 实验组中TGF-β1 + BMP-2联合应用组的糖胺聚糖含量明显高于TGF-β1、BMP-2单独诱导组[(69.90±0.76), (36.65±0.52), (49.12±0.39) μg/孔, $P < 0.05$], BMP-2诱导组的糖胺聚糖的水平高于TGF-β1诱导组($P < 0.05$)。说明TGF-β1 + BMP-2联合应用诱导后BMSCs分泌特异性软骨外细胞质中糖胺聚糖的量较对照组和TGF-β1、BMP-2单独诱导组明显增加。

3 讨论

软骨缺损的修复长期以来是临床上所面临的难题之一, 小面积的软骨缺损一般行损伤软骨切除术或穿透性治疗, 暴露下方的松质骨, 使骨髓中的间充质干细胞向上迁移而修复缺损, 这也只能在一定程度上缓解疼痛, 且当软骨缺损直径大于4 mm时已很难修复^[9-10]。近年来随着组织工程技术的出现为软骨缺损的修复带来了曙光, 它通过分离及培养所需的种子细胞、选择适合的生物支架材料、最后构建组织工程化软骨到缺损部位而完成治疗目的, 目前骨髓间充质干细胞及其在软骨修复方面的研究已取得较大进展^[11-15], 已有报道用骨髓基质干细胞构建组织工程软骨应用于临床的例子^[16-17]。BMSCs是存在于骨髓中的非造血干细胞, 在不同诱导条件下具有向成软骨细胞、成骨细胞、脂肪细胞等分化的潜能^[18-21]。

Swieszkowski等^[22]用人骨髓来源的间充质干细胞分别向成软骨和成骨方向诱导来构建出骨软骨复合体, 近年来向软骨细胞的导向分化一直都是研究的热点, 在体内环境下, BMSC可根据体内微环境信号的指令分化为软骨细胞和其他多种细胞, 但这种分化具有随机性, 且分化效率很低, 同时体内环境的复杂性, 研究个体的差异性都限制了BMSC向软骨细胞分化的研究。在此条件下, 对BMSC向软骨细胞分化的研究逐渐转向体外, 大量试验研究表明可以通过改变细胞密度、加入细胞因子以及提供适宜的培养条件来促进骨髓间充质干细胞向软骨细胞的分化。

软骨主要由胶原纤维和蛋白聚糖构成, 而软骨细胞的主要功能是分泌胶原蛋白和酸性粘多糖^[23], 其中II型胶原占大部分, 它和糖胺聚糖是软骨细胞的特征性标志^[24]。本实验用TGF-β1、BMP-2联合诱导BMSCs向软骨细胞分化, 诱导14 d后, 可见细胞由长梭形变为多角形, 阿利新蓝染色阳性显示分化的细胞分泌糖胺聚糖, II型胶原免疫组织化学染色阳性证实诱导后的细胞有II型胶原表达; 以上结果分别从细胞形态、粘多糖和胶原蛋白水平证实了软骨细胞的存在, 说明该两种细胞因子均可单独诱导BMSCs向软骨细胞分化。同时作者

用DMB比色法定量检测各组糖胺聚糖的分泌, 结果说明TGF-β1、BMP-2联合诱导优于单独诱导组, 二者联合诱导更有助于MSCs向软骨细胞分化。

细胞因子在BMSCs向软骨细胞诱导分化过程中起着重要的作用, 目前发现的具有体内体外促进软骨分化的细胞因子主要有TGF-β、胰岛素样生长因子、BMP、软骨源性发生蛋白等, 其中国内外许多学者成功利用TGF-β1诱导BMSCs向软骨细胞分化, 而对BMP-2作为诱导因子诱导BMSCs向软骨细胞分化的报道较少。

国内学者李中华^[25]成功利用BMP-2作为诱导因子在单层细胞培养模式下诱导BMSCs向软骨细胞分化。Cooch等^[26]发现, 骨形态发生蛋白2、蛋白12和蛋白13均能促进软骨组织形成。TGF-β能诱导转化为软骨细胞, 同时对软骨细胞的分化和功能具有双向调节作用, 促进未分化或分化早期软骨细胞合成、增殖、分化及细胞外基质的合成, 抑制成熟软骨细胞的增殖和分化, 主要作用于诱导的早期阶段, 一般认为TGF-β1可以通过Smad信号传导通道向细胞提供一个具有活性的磷酸根, 调节II型胶原的表达^[27]。近年来研究证实BMP在体内通过与受体结合, 使Smad蛋白磷酸化并释放, 进入细胞核, 启动特定基因的转录与表达, 从而进行成骨和成软骨分化。而BMP-2也称为骨生发蛋白2是关节软骨组织工程中重要的组织生长因子, 该因子被认为调控着软骨细胞的细胞周期循环并与干细胞的分化调控有关^[28], BMP-2具有促进软骨基质的合成与分泌作用, 特别对糖胺聚糖的合成起着重要作用, BMP-2能够引起Sox9和Noggin表达的明显上调, 研究显示通过Sox9控制Noggin是软骨细胞分化一个有力的调节机制^[29]。

实验应用TGF-β1、BMP-2作为诱导因子成功诱导BMSCs向软骨细胞分化, BMSC定向软骨细胞分化是一个复杂的过程, 许多因素决定其转归, 包括三维立体培养环境等^[30]。生长因子对细胞的作用不是单一的过程, 是一种网络式的调节, 生长因子对细胞作用的量效关系、时效关系、细胞因子之间的相互作用及反馈调节尚需进一步研究。因此, 合理有效的利用细胞生长因子在体外促进BMSCs的增殖、分化, 表达软骨细胞表型, 在软骨组织工程中有着不可替代的作用。

4 参考文献

- [1] Huang JR, Li JH, Li WP, et al. Zhongguo Linchuang Jiepouxue Zazhi. 2006;24(6):663-667. 黄建荣, 李建华, 李卫平, 等. 体外诱导人骨髓间充质干细胞分化为软骨细胞的研究[J]. 中国临床解剖学杂志, 2006, 24(6):663-667.
- [2] Noble BS, Dean V. Dextran sulfate promotes the rapid aggregation of porcine bone-marrow stromal cells. Bone. 1995;17(4):375-382.
- [3] Shang QX, Cao YL. Zhongguo Chuangshang Zazhi. 2001;17(1):7-9. 商庆新, 曹宜林. 软骨、骨组织工程的现状与趋势[J]. 中国创伤杂志, 2001, 17(1):7-9.
- [4] Cao YL. Shanghai: Shanghai Science & Technology Press. 2004: 218-219. 曹宜林. 组织工程学理论与实践[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2004: 218-219.

- [5] Palmer GD, Steinert A, Pascher A, et al. Gene2Induced chondrogenesis of primary mesenchymal stem cells in vitro. *Mo I Ther*.2005;12(2):219-228.
- [6] 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.
- [7] Akcay T, Konukoglu D, Dincer Y. Urinary glycosaminoglycan excretion in Urolithiasis. *Arch Dis Child*.1999;80:271-272.
- [8] Davenport CL, Boston RC, Richrdrson DW. Effects of enrofloxacin and magnesium deficiency on matrix metabolism in equine articular cartilage. *AMJ Vet Res*.2001;62:160-166.
- [9] Chen YJ, Wurtz T, Wang CJ, et al. Recruitment of mesenchymal stem cells and expression of TGF- β 1 and VEGF in the early stage of shockwave-promoted bone regeneration of segmental defect in rats. *J Orthop Res*.2004;22(3):526-534.
- [10] Zhang L, Liu Z, Cui P, et al. SIS with tissue-cultured allogenic cartilages patch tracheoplasty in a rabbit model for tracheal defect. *Acta Otolaryngol* 2007;127(6):631-636.
- [11] Reyes M, Lund T, Lenvik T, et al. Purification and ex vivo expansion of human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood*. 2001;98(9):2615-2625.
- [12] Lin JH, Wang RX, Chen L, et al. Zhongguo Xiufu Chongjian Waik Zazhi 2006;20(12):1229-1233. 林建华, 王日雄, 陈雷, 等. 自体骨髓间充质干细胞复合胶原膜修复兔膝关节全层软骨缺损的实验研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2006, 20(12):1229-1233.
- [13] Wang MG, Xia YY, Wang SK, et al. Zhongguo Xiufu Chongjian Waik Zazhi 2007;21(7):753-757. 王冕格, 夏亚一, 王栓科, 等. 骨髓间充质干细胞复合消旋聚乳酸/明胶修复兔膝关节软骨缺损的实验研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2007, 21(7):753-757.
- [14] Zhang JL, Wu Z, Xia YY, et al. Guoji Gukexue Zazhi.2006;27(4):243-245. 张积礼, 武喆, 夏亚一, 等. 骨髓间充质干细胞修复软骨缺损研究进展 [J]. 国际骨科学杂志, 2006, 27(4):243-245.
- [15] Zhang Y, Song JF, Bai JQ. Zhongguo Meitan Gongye Yixue Zazhi. 2007;10(1):1-3. 张翼, 宋敬锋, 白俊清. 骨髓间充质干细胞研究进展及在软骨组织工程中的应用[J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2007, 10(1):1-3.
- [16] Wakitani S. Present status and perspective of articular cartilage regeneration. *Yakugaku Zasshi*.2007;127(5):857-863.
- [17] Wakitani S, Imoto K, Yamamoto T, et al. Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. *Osteoarthritis Cartilage*.2002;10(3):199-206.
- [18] Verbruggen G, Wang J, Wang L, et al. Analysis of chondrocyte functional markers and pericellular matrix components by flow cytometry. *Methods Mol Med* 2004;100:183-208.
- [19] Pang YG, Cui PC, Chen WX, et al. Xibao yu Fenzi Mianyixue Zazhi. 2004;20(3):306-309. 庞永刚, 崔彭城, 陈文弦, 等. 人骨髓间充质干细胞作为骨、软骨组织工程种子细胞的实验研究[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2004, 20(3):306-309.
- [20] Bianco P, Riminucci M. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells*.2001;19:180-192.
- [21] Elisabeth HJ, Kirstin JB, Alan WF. Mesenchymal stem cells: Paradoxes of passaging. *Exp Hemato*.2004;32:414-425.
- [22] Swieszkowski W, Tuan BH, Kurzydowski KJ, et al. Repair and regeneration of osteochondral defects in the articular joints. *Biomolecular Engineering*. 2007;24(5):489-495.
- [23] Wang WY, Zhang Y, Wang XD. Shiyong Quanke Yixue. 2008, 6(5):443-444. 王武愉, 张亚, 王晓东. 诱导兔骨髓间充质干细胞向软骨细胞分化的试验研究[J]. 实用全科医学, 2008, 6(5):443-444.
- [24] Bosnakovski D, Mizuno M, Kim G, et al. Chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) in different hydrogels: influence of collagen type II extracellular matrix on MSC chondrogenesis. *Bio Technol Bioeng*.2006;93(6):1152-1163.
- [25] Li ZH, Luan BH. Shandong Daxue Xuebao: Yixueban. 2008; 46(2):159-162. 李中华, 栾保华. 体外诱导兔骨髓间充质干细胞向软骨细胞分化的试验研究[J]. 山东大学学报: 医学版, 2008, 46(2):159-162.
- [26] Cooch KJ, Blunk T, Courter DL, et al. Bone morphogenetic proteins 2, -12 and -13 modulate in vitro development of engineered cartilage. *Tissue Eng*.2006; 8(4):591-601.
- [27] Zhang Q, An RZ, Wang ZJ, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2008;12(49):9731-9734. 张强, 安荣泽, 王兆杰, 等. 兔软骨基质支架与脂肪干细胞的生物相容性[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(49):9731-9734.
- [28] Reddi AH. Morphogenesis and Tissue Engineering of Bone and Cartilage: Inductive Signals, Stem Cells, and Biomimetic Biomaterials. *Tissue Engineering*.2000;6(4):351-359.
- [29] Zehentner BK, Haussmann A, Burtscher H. The bone morphogenetic protein antagonist Noggin is regulated by Sox9 during endochondral differentiation. *Dev Growth Differ*.2002;44:1-9.
- [30] Lu HD, Cai DZ, Qin Y, et al. Zhongguo Guyuguanjie Sunshang Zazhi.2006;21(6):453-456. 卢华定, 蔡道章, 秦驥, 等. I型胶原负载骨髓基质细胞修复兔膝关节软骨缺损[J]. 中国骨与关节损伤杂志, 2006;21(6):453-456.

来自本文课题的更多信息--

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

课题的创新性: 以往对于骨髓间充质干细胞向软骨细胞的诱导的因子多集中于转化生长因子 $\beta 1$ 的研究, 对骨形态发生蛋白2的研究多集中于其成骨效应上, 近年来有的文献报道骨形态发生蛋白2也可具有成软骨效应, 其软骨效应多集中在对糖胺聚糖的分泌上, 而转化生长因子 $\beta 1$ 的成软骨效应在II型胶原的表达上要强一些。所以课题设计的创新之处在于同时应用转化生长因子 $\beta 1$ 和骨形态发生蛋白2两种诱导因子进行诱导, 来发挥其协同效应从而取得更为理想的诱导效果。

课题评估的“金标准”: 目前国内外文献报道评价骨髓间充质干细胞向软骨细胞分化的标准有二, 即II型胶原表达和糖胺聚糖的表达。

设计或课题的偏倚与不足: 转化生长因子 $\beta 1$ 和骨形态发生蛋白2两种因子之间的协同效应机制还有待进一步从生物信号传导方面进行研究, 此外实验未对剂量-效应关系进行对照研究, 需在后续实验中深入分析。

提供临床借鉴的价值: 实验结果对临床上软骨种子细胞的来源提供实验理论依据, 且提供一种更为理想软骨细胞诱导条件培养基。