

犬骨髓间充质干细胞分离纯化和成骨诱导分化：Ficoll液密度梯度离心法体外分离的可行性*★

解芳, 滕利, 蔡磊, 徐家杰, 靳小雷, 肖苒, 曹谊林

Isolation, purification and osteoinduction differentiation of canine bone marrow mesenchymal stem cells: Feasibility of *in vitro* isolation using Ficoll density gradient centrifugation

Xie Fang, Teng Li, Cai Lei, Xu Jia-jie, Jin Xiao-lei, Xiao Ran, Cao Yi-lin

Abstract

BACKGROUND: Classic isolation method of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) is Percoll density gradient centrifugation. Blood cell component was removed. However, this method is complicated. Preparation density was needed when isolating dog bone marrow. Moreover, centrifugation was frequent, which had a great damage to cells.

OBJECTIVE: To establish methods of the isolation, proliferation, culture and osteoinduction of canine BMSCs, and observe the *in vitro* proliferation and ability to osteoinduction differentiation.

METHODS: 10 mL bone marrow was extracted from dog posterior superior iliac spine, heparin anticoagulation, diluted using Hanks juice, treated with 1.077 g/mL Ficoll solution 3 mL, and centrifuged at 2 000 r/min for 20 minutes. Karyocytes were absorbed to form white cloudlike layering interface, and then centrifuged twice using DMEM supplemented with fetal bovine serum, incubated at $12 \times 10^4/\text{cm}^2$ at 37 °C in a 5% CO₂ incubator. Following subculture, cells were incubated in DMEM containing dexamethasone, β -sodium phosphoglycerol and ascorbic acid 2-phosphate. Immunocytochemical staining and immunofluorescence staining were utilized to detect osteocalcin, osteopontin and type I collagen expression in osteoblasts. Alkaline phosphatase staining and alizarin red staining were performed.

RESULTS AND CONCLUSION: 1.077 g/mL Ficoll density gradient centrifugation was used to isolate karyocytes that were significant compared with Percoll solution. Obtained BMSCs had high purity, good growth and the mean doubling time was 24 hours. Following *in vitro* osteogenic incubation of dog BMSCs, osteocalcin, osteopontin and type I collagen showed positive expression. Alkaline phosphatase staining demonstrated bluish-green cytoplasm. Alizarin red staining showed red nodes in extracellular matrix, and could differentiate into osteoblasts *in vitro*.

Plastic Surgery Hospital, Peking Union Medical College & Chinese Academy of Medical Science, Beijing 100144, China

Xie Fang★, Studying for master's degree, Plastic Surgery Hospital, Peking Union Medical College & Chinese Academy of Medical Science, Beijing 100144, China

Correspondence to: Teng Li, Doctor, Professor, Chief physician, Doctoral supervisor, Plastic Surgery Hospital, Peking Union Medical College & Chinese Academy of Medical Science, Beijing 100144, China tenglidr@sina.com

Correspondence to: Cao Yi-lin, Doctor, Professor, Plastic Surgery Hospital, Peking Union Medical College & Chinese Academy of Medical Science, Beijing 100144, China yilincao@yahoo.com

Supported by: the Clinical Speciality Key Program of Public Health Ministry of China, No. 3030426-04*

Received: 2009-08-25
Accepted: 2009-12-29

Xie F, Teng L, Cai L, Xu JJ, Jin XL, Xiao R, Cao YL. Isolation, purification and osteoinduction differentiation of canine bone marrow mesenchymal stem cells: Feasibility of *in vitro* isolation using Ficoll density gradient centrifugation. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(6): 951-956. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 目前骨髓间充质干细胞较经典的分离方法是 Percoll 密度梯度离心法, 以去除血细胞成分, 但该法操作较为复杂, 分离犬骨髓时需要配制密度, 且离心次数较多, 对细胞损伤大。

目的: 拟建立可靠、高纯度的犬骨髓间充质干细胞体外分离纯化方法, 并观察其在体外扩增、成骨诱导分化的能力。

方法: 于犬髂后上棘抽取骨髓液 10 mL, 肝素抗凝, Hanks 液稀释后, 加入 1.077 g/mL Ficoll 液 3 mL, 2 000 r/min 离心 20 min, 吸取有核细胞形成白云雾状的分层界面, 用含胎牛血清的 DMEM 离心 2 遍, 按 $12 \times 10^4/\text{cm}^2$ 密度接种, 于 37 °C、体积分数为 5% 的 CO₂ 培养箱内培养。细胞传代后, 加入含地塞米松、 β -磷酸甘油钠、L-2-磷酸抗坏血酸的 DMEM 成骨条件培养液进行诱导。免疫细胞化学染色和免疫荧光染色检测成骨细胞特征性分泌蛋白骨钙素、骨桥蛋白的表达, 以及 I 型胶原的表达, 并进行碱性磷酸酶染色与茜素红染色。

结果与结论: 1.077 g/mL Ficoll 液密度梯度离心法分离所得的有核细胞层相对于 Percoll 液分层明显, 可获得纯度较高的骨髓间充质干细胞, 接种细胞生长良好, 平均倍增时间为 24 h。犬骨髓间充质干细胞体外成骨诱导培养后, 骨钙素、骨桥蛋白、I 型胶原均呈阳性表达, 碱性磷酸酶染色后细胞胞浆呈蓝绿色, 茜素红染色后细胞外基质中出现散在的红色结节, 可在体外定向分化为成骨细胞。

关键词: 成骨诱导; Ficoll; 密度梯度离心; 犬; 骨髓间充质干细胞; 干细胞

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.06.001

解芳, 滕利, 蔡磊, 徐家杰, 靳小雷, 肖苒, 曹谊林. 犬骨髓间充质干细胞分离纯化和成骨诱导分化: Ficoll 液密度梯度离心法体外分离的可行性[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(6):951-956.

[http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

中国医学科学院/
北京协和医学院,
整形外科医院, 北京
市 100144

解芳*, 女,
1984年生, 山西
省太原市人, 汉族,
北京协和医学院在
读硕士, 主要从事
骨组织工程方面
的研究。
cristina_jackson
2000@yahoo.
com.cn

通讯作者: 滕
利, 博士, 教授,
主任医师, 博士生
导师, 中国医学科
学院/北京协和医
学院, 整形外科医
院, 北京市
100144
tenglidr@sina.
com

共同通讯作者: 曹
谊林, 博士, 教授,
中国医学科学院/
北京协和医学院,
整形外科医院, 北
京市 100144
yilincao@yahoo.
com

中图分类号: R394.2
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225
(2010)06-00951-06

收稿日期 2009-08-25
修回日期 2009-12-29
(20090825002/
ZS-Q)

0 引言

骨髓间充质干细胞具有多向分化潜能, 在体外特定培养条件下可以分化为成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞及成肌细胞等^[1-4], 并且多项研究表明能用于骨、韧带、膀胱、心肌以及脊柱的治疗^[5-19], 获取时对机体损伤小, 易于扩增, 随着干细胞研究的深入, 骨髓间充质干细胞为解决骨组织工程种子细胞来源问题开辟了新的途径。

目前骨髓间充质干细胞分离方法中较经典的方法是Percoll分离液密度梯度离心法, 以去除血细胞成分^[17, 19-24]。但该方法操作较为复杂, 分离犬骨髓时需要配制密度, 且离心速度较大, 次数较多, 对细胞损伤较大。实验采用Ficoll分离液密度梯度离心法分离Beagle犬骨髓间充质干细胞, 对分离得到的骨髓间充质干细胞在体外培养扩增, 并进行成骨细胞诱导分化, 检测其成骨活性, 以掌握和分析该细胞的分离纯化、扩增、成骨诱导的方法和规律。

1 材料和方法

设计: 细胞学体外观察。

时间及地点: 于2008-01/2009-07在中国医学科学院/北京协和医学院, 整形外科医院整形外科研究所完成。

材料: 普通级成年Beagle犬4只, 体质量10~13 kg, 雌雄不限, 经北京实验动物质量检测, 由解放军总医院动物房提供并进行饲养, 实验过程中对动物的处置符合动物伦理学标准。

实验用主要试剂与仪器:

试剂与仪器	来源
Ficoll-Paque Plus 液	Amersham Biosciences 公司
Percoll 原液、地塞米松、β-磷酸甘油钠、L-2-磷酸抗坏血酸	Sigma 公司
BM Purple 染色剂	Boehringer Mannheim 公司
骨钙素、骨桥蛋白、I 型胶原单克隆抗体	Abcam 公司
DMEM 低糖培养基、标准胎牛血清、Hanks 液、胰蛋白酶、EDTA	HyClone 公司
倒置相差显微镜	Olympus

实验方法:

犬骨髓间充质干细胞的分离纯化、培养扩增:

犬麻醉后常规备皮、消毒、铺巾, 于髂后上棘穿刺抽取骨髓液10 mL, 加入含有3 000 U肝素的50 mL无菌离心管中。取3 mL肝素化的骨髓液, 加入3 mL Hank's液, 制成6 mL稀释骨髓液。分别取3 mL 1.077 g/mL Ficoll液以及配好的1.063 g/mL Percoll液, 加入4只15 mL离心管中, 小心加入6 mL稀释骨髓液, 2 000 r/min离心20 min; 有核细胞形成白色云雾状的分层界面, 小心吸取该细胞层, 用含体积分数为10%胎牛血清的DMEM以1 000 r/min离心5 min, 共2遍, 然后进行细胞计数。最后将细胞悬液按 $12 \times 10^4/\text{cm}^2$ 密度接种于100 mm²培养皿, 置于37 °C、体积分数为5%的CO₂培养箱内培养。倒置相差显微镜下观察体外培养细胞的生长、增殖情况。

犬骨髓间充质干细胞向成骨细胞的诱导分化:

原代骨髓间充质干细胞接种后48 h换液, 去除未贴壁的细胞, 继续培养。约5 d后细胞生长达80%融合, 胰蛋白酶-EDTA消化, 按 $1.6 \times 10^4/\text{cm}^2$ 密度传代。第1次传代后, 一部分细胞加入含10 nmol/L地塞米松、10 mmol/L β-磷酸甘油钠、50 μmol/L L-2-磷酸抗坏血酸的DMEM成骨条件培养液; 另一部分细胞作为阴性对照, 仍用普通含血清培养基进行培养。以后每3 d传代1次, 传至第3代细胞进行计数。

成骨细胞特征性分泌蛋白骨钙素、骨桥蛋白的免疫细胞化学染色和免疫荧光染色: 取经体外成骨诱导培养的第1, 2, 3代细胞爬片, 40 g/L多聚甲醛固定, 二步法进行骨钙素、骨桥蛋白免疫细胞化学染色, 并且对骨桥蛋白行免疫荧光染色, 检测骨髓间充质干细胞体外诱导培养后的成骨活性。以未成骨诱导的骨髓间充质干细胞作为阴性对照。

I 型胶原检测: 取第1, 2, 3代细胞爬片, 40 g/L多聚甲醛固定, 进行I型胶原免疫细胞化学染色, 检测胶原基质分泌情况。

生化检测:

碱性磷酸酶染色: 取经体外成骨诱导培养的第1, 2, 3代细胞爬片, 4 g/L多聚甲醛固定, BM Purple染色。

茜素红染色: 玻片制备同前, 体积分数为95%的乙醇固定1 h, 行2%茜素红染色。

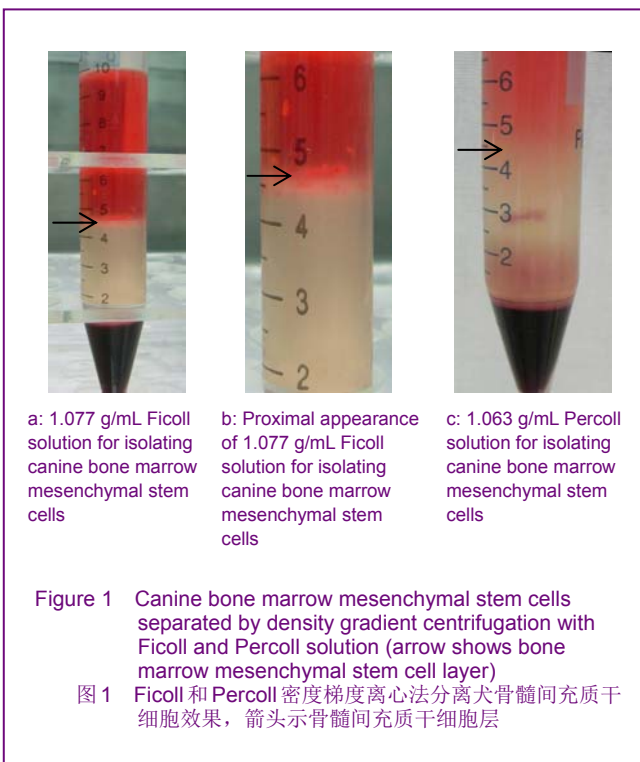
主要观察指标: ①Ficoll和Percoll密度梯度离心法分离骨髓间充质干细胞效果的比较。②骨髓间充质干细胞的分离纯化及培养扩增情况。

③诱导后骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的鉴定。

设计、实施、评估者: 设计为第二作者, 干预实施为第一作者, 结果评估为第六作者, 均经过系统培训, 未使用盲法评估。

2 结果

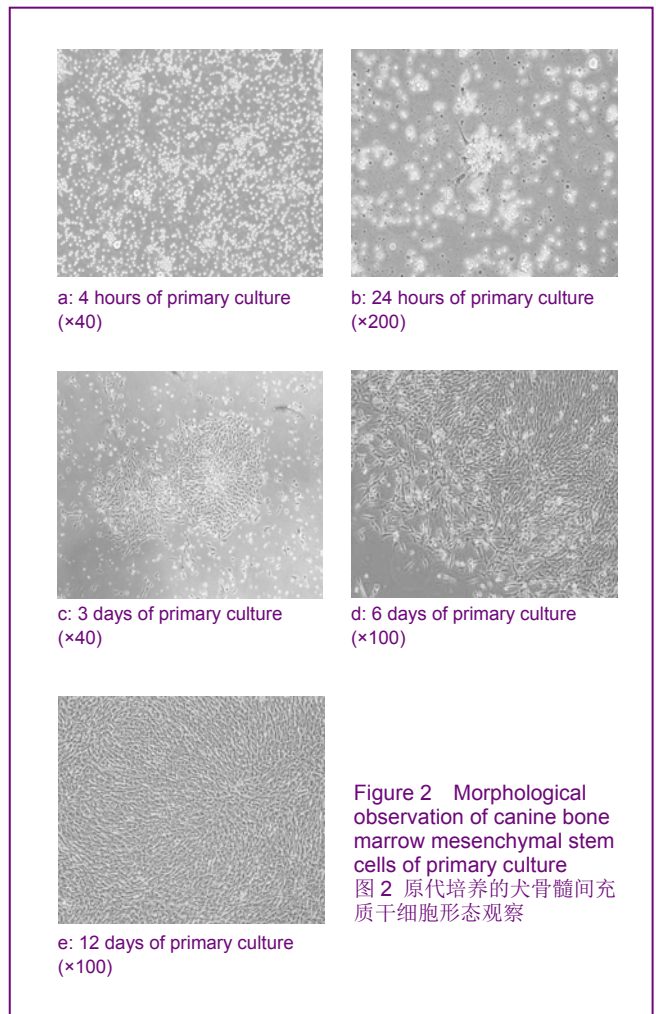
2.1 Ficoll和Percoll密度梯度离心法分离骨髓间充质干细胞效果的比较 分别用 1.077 g/mL Ficoll 液和 1.063 g/mL Percoll 液分离犬骨髓, Ficoll 液分离所得的有核细胞层相对于 Percoll 液分层明显, 说明 Ficoll 密度梯度离心法分离骨髓间充质干细胞效果较好, 见图 1。



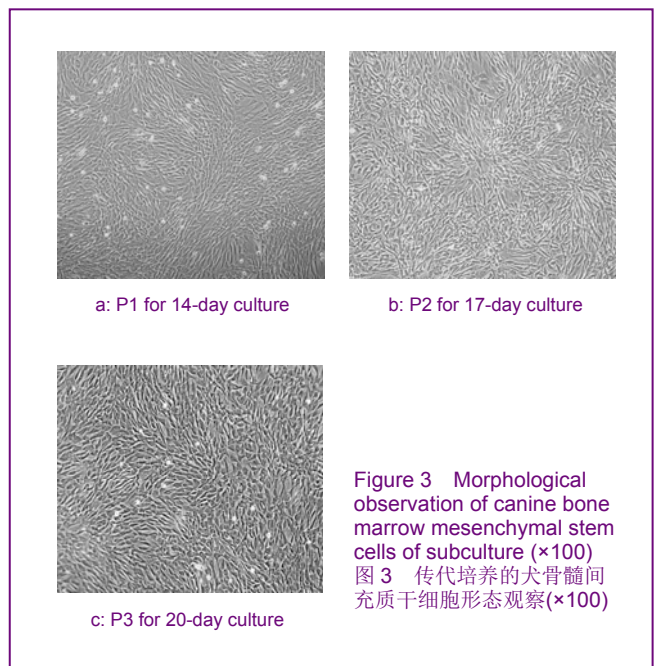
2.2 骨髓间充质干细胞的分离纯化及培养扩增

原代培养: 用 1.077 g/mL Ficoll 液分离 10 mL 犬骨髓, 可获得骨髓间充质干细胞 $(18 \pm 3) \times 10^9 \text{ L}^{-1}$, 见图 2a。接种培养 24 h 即可出现少量的细胞集落形成单位, 见图 2b。36~48 h 内细胞集落形成单位迅速变大, 72 h 即可增殖形成大而清晰的细胞集落形成单位, 而且经过换液使视野更加清楚, 所以此时易于进行细胞集落形成单位计数, 见图 2c。经统计, 原代细胞培养 3 d 可形成 (380 ± 95) 个细胞集落形成单位/mL, 即每 $(4 \pm 2) \times 10^4$ 个骨髓间充质干细胞有 1 个细胞集落形成单位, 随着不断换液培养, 贴壁细胞增殖速度逐渐加快, 各细胞集落形成单位之间逐渐相连, 同时细胞形态由稀疏时的多角形变为纺锤状, 呈漩涡状、螺旋状密集排列, 见图 2d。原代培养 10~13 d 细胞集落形成单位生长密集, 中心出现较密的立方体细胞, 需进行消化传代, 此时骨髓间充质干细胞

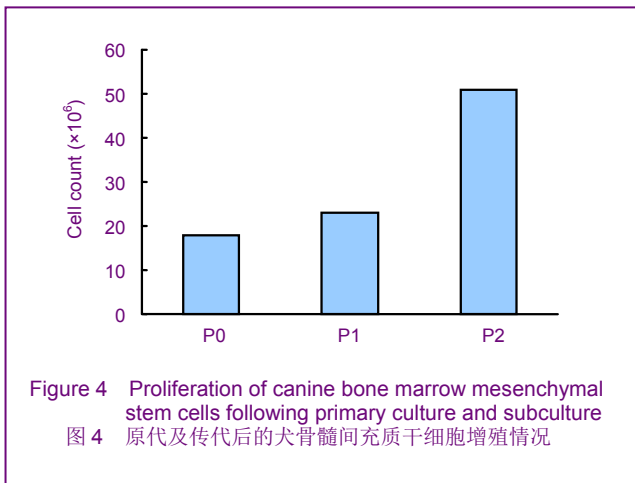
数量为 $(18 \pm 1) \times 10^9 \text{ L}^{-1}$, 见图 2e。



传代培养: 传代后的骨髓间充质干细胞进入快速增殖期, 且细胞体积逐渐增大, 细胞数逐渐增多, 由第 1 代的 $(23 \pm 2) \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 扩增到第 3 代的 $(51 \pm 3) \times 10^9 \text{ L}^{-1}$, 见图 3。

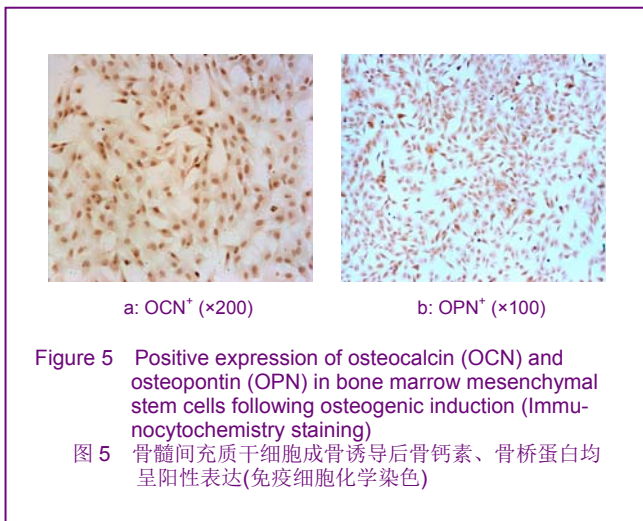


第1~3代骨髓间充质干细胞倍增周期为1 d, 见图4。

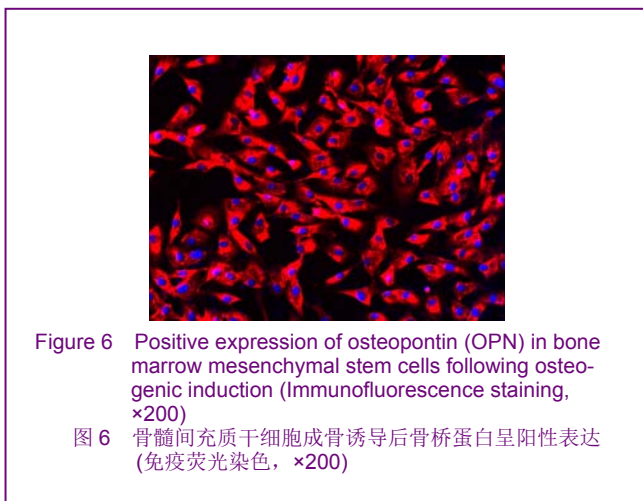


2.3 诱导后骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的鉴定

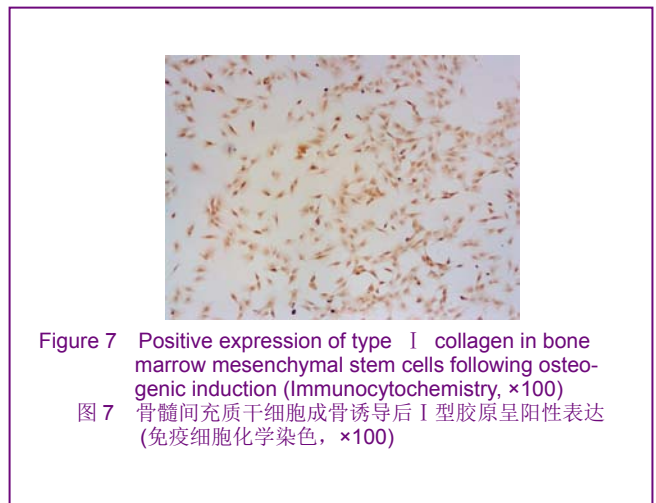
骨钙素、骨桥蛋白的表达: 免疫细胞化学染色结果显示, 骨髓间充质干细胞成骨诱导后骨钙素、骨桥蛋白均呈阳性表达, 显示棕黄色, 见图5。



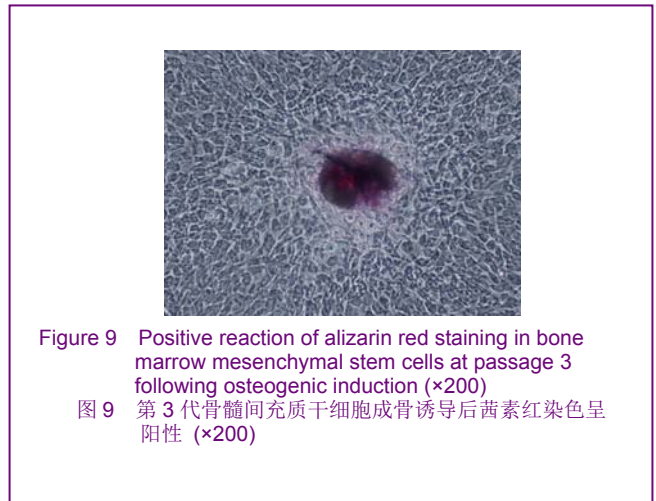
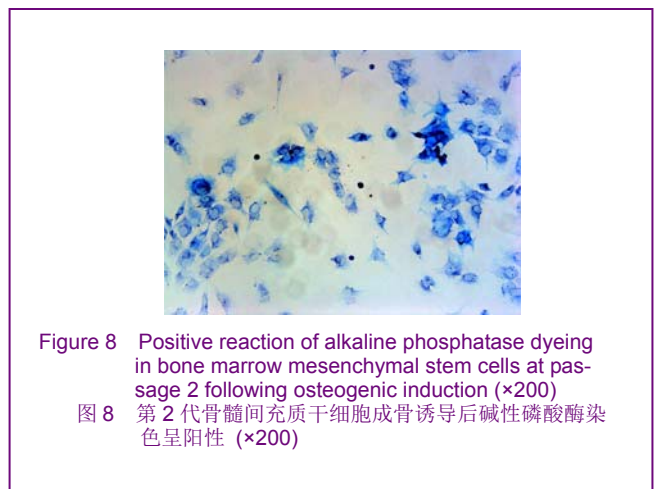
免疫荧光染色结果显示, 骨髓间充质干细胞成骨诱导后骨桥蛋白呈阳性表达, 显示红色荧光, 见图6。



I型胶原的表达: 免疫细胞化学染色结果显示, 骨髓间充质干细胞成骨诱导后I型胶原呈阳性表达, 显示浅棕色, 见图7。



生化检测: 体外成骨诱导培养的第2, 3代骨髓间充质干细胞, 碱性磷酸酶染色呈阳性, 细胞胞浆呈蓝、绿色, 见图8; 茜素红染色呈阳性, 可见细胞外基质中出现散在的红色结节, 部分红染结节的中心呈黑色, 见图9。



3 讨论

骨组织工程种子细胞主要来自骨组织、骨膜、骨髓和骨外组织, 利用组织工程的原理获取新生骨组织的方法已经成为治疗骨缺损、骨不连的全新修复方法。联合人工合成生物材料对骨缺损、骨不连进行治疗是国内外研究的热点, 具有以下优势: ①不受供体骨来源的限制。②采用自体组织细胞培养后移植, 避免了异体组织移植中免疫排斥反应。③人工生物材料的形状、大小可根据不同组织及实际需要而设计和塑形, 不受供体骨形状的限制, 其最终目的就在于提供一种理想的、来源广泛、应用简便、疗效确切的生物活性骨组织^[25-28]。近年来国内外研究人员发现, 骨髓内的间充质干细胞在骨组织受到创伤刺激和局部微环境因素的影响, 能够进行增殖, 并经骨原细胞、前成骨细胞最终分化为成骨细胞, 以参与组织更新和创伤修复等^[28-29]。

目前骨髓间充质干细胞的分离方法有贴壁筛选法、密度梯度离心法、特制培养板筛选法、磁珠分离法等^[30-34]。全骨髓法是常用的贴壁筛选方法, 用培养液稀释骨髓后直接培养, 通过换液去除血细胞成分而得到骨髓间充质干细胞, 但是由于混杂各种细胞成分, 其分离培养效果不佳。特制培养板筛选法比较繁琐, 且分离效果一般。磁珠分离法成本较高, 分离效果虽然较好, 可细胞损失较大。密度梯度离心法是将骨髓组织用淋巴细胞分离液进行密度梯度离心, 以去除血细胞成分, 操作简单, 分离培养效果佳。

实验中抽取的骨髓包含大量血细胞和少量基质干细胞, 通过密度梯度离心的方法先对骨髓进行细胞分离, 可以将大部分红细胞、脂肪细胞和血小板去除, 获得纯度较高的骨髓间充质干细胞。将有核细胞层细胞培养48 h后即有大量细胞贴壁, 同时培养瓶内悬浮有未贴壁的造血干细胞, 经多次换液后即能去除, 从而获得均一性较好的骨髓间充质干细胞。以往被普遍使用的Percoll分离法操作较复杂, 且分离效果不甚理想。实验利用Ficoll分离液对犬骨髓进行分离, 发现通过Ficoll液可获得相对较高纯度的骨髓间充质干细胞, 此外操作简单, 无需进行稀释配制密度, 可直接用于骨髓间充质干细胞的分离纯化。相对于传统的全骨髓法和Percoll分离法, 有明显的优越性, 有利于提高实验效率。

实验中骨髓间充质干细胞经历了潜伏期、对数生长期和平台期, 传代后细胞生长速度明显增加, 对数生长期细胞的倍增时间为24 h。原代培养需要10~13 d, 而传代后细胞仅需两三天便能再次传代, 传代后细胞贴壁增殖速度加快, 一般1 d后即可贴壁生长, 两三天后细胞增殖, 相互融合达80%以上, 可再次传代。

骨髓间充质干细胞具有成骨分化潜能, 能在特定转

录因子调控下向不同的方向分化^[35-38]。实验用含地塞米松、 β -磷酸甘油钠、L-2-磷酸抗坏血酸的DMEM成骨条件培养液对骨髓间充质干细胞诱导4周。碱性磷酸酶染色是鉴定成骨细胞的生化和组织学标志, 临床上用于评价骨发生, 染色结果表明成骨细胞分化首先发生在集落中心, 然后周边细胞逐渐出现碱性磷酸酶染色阳性, 进入细胞分化阶段。茜素红染色可观测细胞外基质中的钙盐沉积, 随着成骨分化越好, 钙盐沉积越多, 实验结果第3代骨髓间充质干细胞茜素红染色明显。骨桥蛋白是骨髓间充质干细胞最早合成的基质蛋白, I型胶原与碱性磷酸酶一样在早期表达较高, 最后骨钙素和细胞外基质钙化同时出现。骨桥蛋白在间充质细胞分化早期开始表达, 通过与膜受体CD34相互作用, 影响骨发生与再生时细胞的迁移; 而骨钙素由成骨细胞合成, 与细胞外基质钙化高度相关, 是骨细胞外基质特异性蛋白, 它们都为骨特征性标志蛋白。实验中骨桥蛋白、骨钙素以及I型胶原免疫荧光或免疫细胞化学染色的阳性结果都表明骨髓间充质干细胞具有成骨分化的能力。

实验结果表明1.077 g/mL Ficoll密度梯度离心分离法的可靠性, 免疫细胞化学染色显示分离培养的犬骨髓间充质干细胞表型稳定, 在体外可稳定传代, 增殖速度较快, 在条件培养基中能够形成钙化的骨样组织, 可以为组织工程提供理想的种子细胞。

4 参考文献

- [1] Granero-Molto F, Weis JA, Longobardi L, et al. Role of mesenchymal stem cells in regenerative medicine: application to bone and cartilage repair. *Expert Opin Biol Ther*.2008;8(3): 255-268.
- [2] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*.1999;284(5411): 143-147.
- [3] Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002; 418(6893):41-49.
- [4] Kang SW, Lee JS, Park MS, et al. Enhancement of in vivo bone regeneration efficacy of human mesenchymal stem cells. *J Microbiol Biotechnol*.2008;18(5):975-982.
- [5] Bruder SP, Jaiswal N, Ricalton NS, et al. Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration. *Clin Orthop Relat Res*.1998(355 Suppl):S247-256.
- [6] Ciavarella S, De Matteo M, Cafforio P, et al. Mesenchymal stem cells and bone regeneration. *Recent Prog Med*.2008;99(2):75-82.
- [7] Li H, Yan F, Lei L, et al. Application of autologous cryopreserved bone marrow mesenchymal stem cells for periodontal regeneration in dogs. *Cells Tissues Organs*. 2009;190(2):94-101.
- [8] Waese EY, Kandel RA, Stanford WL. Application of stem cells in bone repair. *Skeletal Radiol*.2008;37(7):601-608.
- [9] Kreuz PC, Steinwachs MR, Erggelet C, et al. Results after microfracture of full-thickness chondral defects in different compartments in the knee. *Osteoarthritis Cartilage*.2006;14(11): 1119-1125.
- [10] Strauss EJ, Goodrich LR, Chen CT, et al. Biochemical and biomechanical properties of lesion and adjacent articular cartilage after chondral defect repair in an equine model. *Am J Sports Med*. 2005;33(11):1647-1653.
- [11] Yokoo N, Saito T, Uesugi M, et al. Repair of articular cartilage defect by autologous transplantation of basic fibroblast growth factor gene-transduced chondrocytes with adeno-associated virus vector. *Arthritis Rheum*. 2005;52(1):164-170.
- [12] Young RG, Butler DL, Weber W, et al. Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. *J Orthop Res*. 1998;16(4):406-413.
- [13] Atala A, Bauer SB, Soker S, et al. Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *Lancet*. 2006;367(9518): 1241-1246.

- [14] Chung SY, Krivorov NP, Rausei V, et al. Bladder reconstitution with bone marrow derived stem cells seeded on small intestinal submucosa improves morphological and molecular composition. *J Urol*. 2005;174(1):353-359.
- [15] Hakenberg OW. Re: tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *Eur Urol*. 2006;50(2):382-383.
- [16] Zhang Y, Lin HK, Frimberger D, et al. Growth of bone marrow stromal cells on small intestinal submucosa: an alternative cell source for tissue engineered bladder. *BJU Int*. 2005;96(7):1120-1125.
- [17] Guo QC, Li ZQ, Zhang Y, et al. *Zhonghua Xiongxin Xueguan Waike Zazhi*. 2005;21(2):97-100.
郭启仓, 李占清, 张宇, 等. 骨髓间充质干细胞分化为心肌细胞的实验研究[J]. *中华胸心血管外科杂志*, 2005, 21(2):97-100.
- [18] Bambakidis NC, Theodore N, Nakaji P, et al. Endogenous stem cell proliferation after central nervous system injury: alternative therapeutic options. *Neurosurg Focus*. 2005;19(3):E1.
- [19] Wright KT, Masri WE, Osman A, et al. The cell culture expansion of bone marrow stromal cells from humans with spinal cord injury: implications for future cell transplantation therapy. *Spinal Cord*. 2008;46(12):811-817.
- [20] An WD, Hu X, Cao L, et al. *Yixue Yanjiu Tongxun*. 2005;34(5):10-12.
安伟德, 胡祥, 曹亮, 等. 体外诱导大鼠骨髓间充质干细胞定向分化肝样细胞[J]. *医学研究通讯*, 2005, 34(5):10-12.
- [21] Wang D, Wu ZX, Sun HY, et al. *Zhonghua Chuangshang Zazhi*. 2005;21(12):902.
王东, 武展雄, 孙海钰, 等. 骨髓基质细胞移植联合应用脑源性神经营养因子促进大鼠脊髓损伤修复[J]. *中华创伤杂志*, 2005, 21(12):902.
- [22] Wang Y, Wang ZW, Lu YH, et al. *Nantong Daxue Xuebao*. 2005; 25(3): 157-160.
王勇, 王志伟, 陆玉华, 等. 成人骨髓间充质干细胞的体外分离培养和生物学特性[J]. *南通大学学报: 医学版*, 2005, 25(3):157-160.
- [23] Yang BL, Liu YJ, Guo L, et al. *Zhongguo Shiyan Zhenduanxue*. 2004;8(6):605-606.
杨柏梁, 刘雅娟, 郭丽, 等. 大鼠仔鼠骨髓间充质干细胞体外分离培养与鉴定[J]. *中国实验诊断学*, 2004, 8(6):605-606.
- [24] Yin HY, Liu GP, Cui L, et al. *Zuzhi Gongcheng yu Chongjian Waike*. 2007;3(5):277-279, 295.
尹宏宇, 刘广鹏, 崔磊, 等. Percoll法分离犬骨髓单个核细胞与体外成骨诱导培养的实验研究[J]. *组织工程与重建外科*, 2007, 3(5):277-279, 295.
- [25] Jafarian M, Eslaminejad MB, Khojasteh A, et al. Marrow-derived mesenchymal stem cells-directed bone regeneration in the dog mandible: a comparison between biphasic calcium phosphate and natural bone mineral. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008;105(5):e14-24.
- [26] Khojasteh A, Eslaminejad MB, Nazarian H. Mesenchymal stem cells enhance bone regeneration in rat calvarial critical size defects more than platelet-rich plasma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008;106(3):356-362.
- [27] Lelic P, Sodek J, McCulloch CA. Osteopontin and bone sialoprotein expression in regenerating rat periodontal ligament and alveolar bone. *Anat Rec*. 1996;244(1):50-58.
- [28] Xu XQ, Wu H. *Linchuang Waike Zazhi*. 2009;17(1):53-55.
徐西强, 吴华. 骨髓间充质干细胞及其在骨组织工程中的研究进展[J]. *临床外科杂志*, 2009, 17(1):53-55.
- [29] Jones E, McGonagle D. Human bone marrow mesenchymal stem cells in vivo. *Rheumatology (Oxford)*. 2008;47(2):126-131.
- [30] Miyazaki M, Zuk PA, Zou J, et al. Comparison of human mesenchymal stem cells derived from adipose tissue and bone marrow for ex vivo gene therapy in rat spinal fusion model. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2008;33(8):863-869.
- [31] Xia WJ, Xu R, Ye X, et al. [Biological appraisal of human bone marrow mesenchymal stem cells during ex-vivo expansion]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. 2008;16(3):639-644.
- [32] Chen HY, Niu P, Zhao S, et al. *Jiepo Xue Xue Jinzhan*. 2007;13(2):190-192.
陈欢意, 牛平, 赵帅, 等. 改良贴壁培养法简单的骨髓基质干细胞分离纯化法[J]. *解剖科学进展*, 2007, 13(2):190-192.
- [33] Deng JP, Dai ZQ, Liu S, et al. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2007;11(3):579-582.
邓近平, 戴钟铨, 刘收, 等. 红细胞裂解法分离及培养大鼠骨髓间充质干细胞[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007, 11(3):579-582.
- [34] Pan H, Wang DW, Li HB, et al. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2007;11(42):8487-8490.
潘华, 王大伟, 李红波, 等. 密度梯度离心与贴壁法相结合体外分离培养兔骨髓基质干细胞: 1~3代细胞生长特性[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007, 11(42):8487-8490.
- [35] Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol*. 2000;28(8):875-884.
- [36] Fridenshtein A, Piatetskii S, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Arkh Anat Gistol Embriol*. 1969; 56(3): 3-11.
- [37] 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.
- [38] Friedenstein AJ, Piatetzky S, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol*. 1966; 16(3):381-390.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 卫生部临床学科重点项目(3030426-04), 课题名称“骨髓基质干细胞的分离及定向分化成骨的实验研究”。

利益冲突: 无利益冲突。

课题的意义: 相对于传统的全骨髓法和 Percoll 分离法, 实验利用 Ficoll 分离液对犬骨髓进行分离有明显的优越性, 有利于提高实验效率。同时也证明了犬骨髓来源间充质干细胞在体外可稳定传代, 增殖速度较快, 在条件培养基中能够形成钙化的骨样组织, 可为骨组织工程提供理想的种子细胞。

课题评估的“金标准”: 成骨分化能力是评估骨髓间充质干细胞分离纯化和成骨诱导培养成功的关键。实验中骨桥蛋白、骨钙素及I型胶原免疫荧光或免疫细胞化学染色的阳性结果, 表明分离培养后的骨髓间充质干细胞具有成骨分化的能力。

课题的偏倚与不足: 分离培养后的骨髓间充质干细胞能否用于临床骨组织工程仍需要进一步动物实验证明和临床试验。

提供临床借鉴的价值: 临床骨组织缺损修复目前最大的挑战就是供体组织来源不足, 而目前骨髓间充质干细胞分离培养的方法繁琐不利于临床工作的开展, 开发一套更为简便实用的方法显得尤为迫切。实验发现 Ficoll 密度梯度离心分离法不仅可获得相对较高纯度的骨髓间充质干细胞, 且操作简单, 无需进行稀释配制密度, 可直接用于犬骨髓间充质干细胞的分离纯化。