

外源性透明质酸对兔骨髓间充质干细胞定向分化为软骨细胞的影响**

寇建强^{1,2}, 王昌耀¹, 王英振¹

Influence of exogenous hyaluronic acid on chondrogenic differentiation of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells

Kou Jian-qiang^{1,2}, Wang Chang-yao¹, Wang Ying-zhen¹

Abstract

BACKGROUND: Hyaluronic acid is the most important component of intra-articular synovial fluid and plays a very important role on the cell morphogenesis, but its effect on bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) in the repair of cartilage defects remains unclear.
OBJECTIVE: To investigate the role of intra-articular environment to the MSCs by studying the influence of exogenous hyaluronic acid on proliferation and chondrogenic differentiation of rabbit bone marrow MSCs.
METHODS: The rabbit MSCs were isolated and cultured in the method of whole bone marrow and adherent culture. The fourth passage of cells were used for the experiment. The experimental group cells were induced by hyaluronic acid solution, with transforming growth factor- β 3 induced group served as a positive control. The negative control group was joined regular medium. The features of chondrocytes were identified by toluidine blue staining, immunohistochemistry and RT-PCR to detect the expression of collagen II after 7, 14, 21 day's induction respectively.
RESULTS AND CONCLUSION: After induced by hyaluronic acid, the speed of cell proliferation slowed down. The cell morphology changed from long spindle to polygonal, oval. The extracellular matrix showed metachromasia with toluidine blue and positive with type II collagen immunohistochemical staining. RT-PCR detection also showed the expression of type II collagen mRNA. All the above showed the characteristics of cartilage cell differentiation. But their expressions were weaker than the positive control group. The results indicated that the exogenous hyaluronic acid can induce the rabbit MSCs differentiate to chondrocytes. But its capacity is weaker than transforming growth factor- β 3. Therefore, the intra-articular environment plays a positive role in promoting chondrogenic differentiation of MSCs and supported that hyaluronic acid could be used as a matrix for cartilage tissue engineering.

Kou JQ, Wang CY, Wang YZ. Influence of exogenous hyaluronic acid on chondrogenic differentiation of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(3):381-385.
[http://www.crter.cn http://en.zgckf.com]

摘要

背景: 透明质酸是关节腔滑液最主要的成分,对细胞的形态发生起着非常重要的作用,但其用于软骨缺损修复时对骨髓间充质干细胞的影响如何呢?
目的: 通过分析外源性透明质酸对兔骨髓间充质干细胞体外增殖及定向分化为软骨细胞的影响,探讨关节腔内环境对骨髓间充质干细胞的作用。
方法: 全骨髓法+贴壁培养法分离培养兔骨髓间充质干细胞,取第4代细胞用于实验,实验组细胞加入透明质酸诱导液,以转化生长因子 β 3诱导组作为阳性对照,阴性对照组加入常规培养液。分别于诱导后第7, 14, 21 d行甲苯胺蓝染色检测蛋白聚糖表达,免疫组化染色及RT-PCR检测细胞II型胶原表达。
结果与结论: 经透明质酸诱导后,细胞增殖速度减慢,由长梭形变为多角形、椭圆形,细胞外基质呈甲苯胺蓝异染性和II型胶原免疫组化阳性,RT-PCR检测示II型胶原mRNA表达阳性,表现出软骨细胞的分化特点,但表达均比阳性对照组弱。结果提示,外源性透明质酸具有诱导兔骨髓间充质干细胞向软骨细胞分化的能力,但比转化生长因子 β 3的诱导能力弱,关节腔内环境对骨髓间充质干细胞向软骨细胞分化有阳性促进作用,支持透明质酸作为软骨组织工程基质使用。
关键词: 透明质酸;骨髓间充质干细胞;软骨细胞;分化;细胞外基质
doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.03.001

寇建强, 王昌耀, 王英振. 外源性透明质酸对兔骨髓间充质干细胞定向分化为软骨细胞的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(3):381-385. [http://www.crter.org http://cn.zgckf.com]

0 引言

骨性关节炎、关节创伤等因素常造成关节软骨缺损,因为软骨细胞属于增生能力极弱的终末分化细胞,自身缺乏有效的修复能力,所以软骨损伤后的修复极为困难。传统的软骨缺损的修复方法都有其局限性。因此,关节软骨缺损的修复一直是当今国内外学者极为关注

的问题。关节软骨属于透明软骨,受损后多被周围组织形成的细胞和基质所替代或修复,但软骨组织的自身修复能力很差,很难恢复原有的结构和功能。目前临床上多通过移植自体或异体成形软骨或具有成软骨潜能的组织(如骨膜、软骨膜等)来治疗关节软骨的缺损,它们虽然能生成透明软骨样组织,但其生物学性能、力学特性、耐磨性、韧性等均不理想,且极易退变。

¹Department of Joint Surgery, ²Central Laboratory, Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266011, Shandong Province, China

Kou Jian-qiang★, Studying for master's degree, Department of Joint Surgery, Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266003, Shandong Province, China; Central Laboratory, Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266033, Shandong Province, China kjqwqq@163.com

Correspondence to: Wang Ying-zhen, Master, Professor, Master's supervisor, Chief physician, Department of Joint Surgery, Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266011, Shandong Province, China wangyingzhenqd@163.com

Supported by: the Natural Science Foundation of Shandong Province, No. Y2006C19*

Received: 2010-07-14 Accepted: 2010-09-29

青岛大学医学院附属医院¹关节外科,² 2 中心实验室, 山东省青岛市 266033

寇建强★, 男, 1984 年生, 山东省寿光市人, 汉族, 青岛大学医学院在读硕士, 主要从事关节外科专业的研究。
kjqqwq@163.com

通讯作者: 王英振, 硕士, 教授, 硕士研究生导师, 主任医师, 青岛大学医学院附属医院关节外科, 山东省青岛市 266033 wangyingzhenqd@163.com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2011)03-00381-05

收稿日期: 2010-07-14
修回日期: 2010-09-29
(20100714015/D·Y)

而应用组织工程学的方法修复关节软骨缺损却展示了令人鼓舞的前景。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)在不同诱导条件下, 具有向成骨、软骨、肌腱、韧带、脂肪、神经及骨髓基质等组织分化的潜能^[1]。透明质酸是关节腔滑液最主要的成分, 对细胞的形态发生起着非常重要的作用。但一直以来, 它是作为软骨细胞支架材料应用于软骨缺损的修复领域, 其本身对BMSCs的影响如何文献报道极少。本课题拟使用外源性透明质酸模拟关节腔内的主要生化环境, 分析其对BMSCs增殖、分化的影响, 为解决BMSCs为基础的组织工程化软骨的临床应用问题奠定良好基础。

1 材料和方法

设计: 细胞形态学观察。

时间及地点: 于2009-09/2010-05在青岛大学医学院附属医院中心实验室完成。

材料: 健康新西兰大白兔6只, 4周龄, 雌雄不限, 体质量约200 g, 清洁级, 由青岛市药品检验所提供, 许可证号: SCXK(鲁)20090006。实验过程符合相关动物伦理学要求^[2]。

主要仪器与试剂:

试剂与仪器	来源
低糖 DMEM 培养基 (LG-DMEM)、高糖 DMEM 培养基(HG-DMEM)、胎牛血清(FBS)	美国 Gibco 公司
转化生长因子 β ₃ 、地塞米松 (Dex)、维生素 C(VitC)	以色列 ProSpec 公司
甲苯胺蓝, 一抗	北京博奥森公司
免疫组化试剂盒	北京中杉金桥公司
总 RNA 提取试剂盒、RT-PCR 试剂盒	日本 TAKARA 公司
染料	美国 Biotium 公司
倒置相差显微镜	OLYMPUS IX50
PCR 仪	德国 Eppendorf 公司
凝胶成像仪	法国 VILBER LOURMAT

实验方法:

兔BMSCs的体外分离与培养: 新西兰大白兔气体栓塞致死, 无菌条件下取下股骨与胫骨, 剪掉骨头两端, 用含体积分数 15%FBS 的 LG-DMEM 反复冲洗髓腔, 将冲洗液直接滴入 50 mL 培养瓶中, 轻轻摇匀, 置于 37 °C、体积分数 5%CO₂ 孵箱内孵育, 3 d 后首次换液, 以后每两三天换液 1 次, 12~14 d 后细胞铺满瓶底,

按常规方法以 1:2 的比例消化传代。传代后的细胞改用含体积分数 10%FBS 的 LG-DMEM 培养。原代细胞记为 P0, 以后依次记为 P1P2……。

BMSCs 的生长曲线测定: 取生长状态良好的 P1P3P5 细胞, 2.5 g/L 胰蛋白酶消化, 以 5×10⁷ L⁻¹ 接种于 96 孔板, 每孔 0.2 mL, 每天取 3 孔消化计数, 每孔计数 3 次, 计算均值, 连续 7~9 d。以培养时间为横轴, 细胞数为纵轴, 绘制生长曲线。

透明质酸诱导兔BMSCs向成软骨细胞分化: 取第3代铺满瓶底的细胞, 常规方法消化, 制成细胞悬液, 细胞计数, 重新调整细胞浓度, 以 1×10⁹ L⁻¹ 的浓度接种于六孔板中, 其中部分六孔板内放置无菌并多聚赖氨酸预处理过的盖玻片。细胞盲法随机分为 3 组, 实验组, 阳性对照组, 阴性对照组。待六孔板内的细胞融合达 80%, 吸去每孔内培养液, 实验组加入透明质酸诱导液(含 0.25 g/L 透明质酸+含体积分数 10%FBS 的 HG-DMEM), 阳性对照组加入软骨诱导液(含 10 μg/LTGF-β₃+1×10⁻⁷ mol/L Dex+50 mg/LVitC+含体积分数 10%FBS 的 HG-DMEM), 阴性对照组加入常规培养液(体积分数 10%FBS 的 HG-DMEM), 置于 37 °C、体积分数 5%CO₂ 孵箱内孵育, 隔日换液, 分别于诱导后第 7, 14, 21 天行相应检测。

形态学观察: 每天在倒置显微镜下观察细胞形态的变化和生长情况。

细胞爬片的甲苯胺蓝染色: 将诱导不同时间的细胞爬片取出, 40 g/L 多聚甲醛固定 1 h, 自来水冲洗 15 min, 蒸馏水冲洗 1 次, 滴加 1% 甲苯胺蓝染液数滴于爬片上, 染色 2~4 h, 蒸馏水冲洗一遍, 加入体积分数 95% 乙醇, 洗去多余的染液, 光镜下观察染色情况满意后, 干燥, 二甲苯透明, 中性树脂胶封固。

免疫组化染色法检测BMSCs II型胶原的表达: 将诱导不同时间的BMSCs爬片取出后, 冷丙酮固定 30 min, PBS 漂洗 5 min×3 次, 按免疫组化试剂盒说明书行 SABC 法染色。

RT-PCR: 按试剂盒(总 RNA 提取试剂盒, RT-PCR 试剂盒)操作说明先提取细胞标本内的总 RNA, 然后再进行 RT-PCR 产物的合成。II 型胶原引物序列如下^[3]: 上游 5' -AAC ACT GCC AAC GTC CAG AT-3', 下游 5' -CTG CAG CAC GGT ATA GGT GA-3'。内参 GAPDH 引物序列: 上游 5' -GAT GCT GGT GCC GAG TAC GT-3', 下游 5' -CCG AAG TGG TCG TGG ATG AC-3'。PCR 反应条件:

94 °C 3 min 预变性, 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 45 s, 37 个循环, 72 °C 退火 10 min。反应产物行 2% 琼脂糖凝胶电泳, GelRed 染色, 采用 BioCaptMW 凝胶成像系统进行图像扫描。

统计学分析: 由第一作者完成。诱导 21 d RT-PCR 显色条带经图像分析系统(Quantity One)检测其积分吸光度 A 值, 与内参 GAPDH 条带的比值为 mRNA 表达水平参数。应用 SPSS 12.0 软件进行统计分析, 组间进行方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 细胞的形态学观察 刚接种时, 大量混杂细胞(红细胞、造血细胞等)悬浮其中, 首次换液后, 少量细胞贴壁, 形态为短梭形, 类似成纤维细胞, 胞核清晰, 可见核仁, 细胞成集落生长, 漩涡状, 7~10 d 时, 大量细胞集落, 细胞变为长梭形, 仍成漩涡状生长, 见图 1。

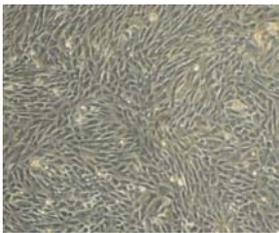


Figure 1 Primary culture of bone marrow mesenchymal stem cells at 7 d ($\times 100$)
图 1 骨髓间充质干细胞原代培养第 7 天($\times 100$)

传代后, 细胞不再成集落生长, 而是均匀分布的平均生长, 24 h 内全部贴壁, 生长速度明显加快, 经历 24~48 h 的缓滞期后迅速进入对数生长期, 细胞形态为长梭形、短梭形、多角形, 3~7 d 长至汇合, 见图 2, 3。

加诱导液以后, 实验组和阳性对照组细胞较阴性对照组生长速度明显减慢, 细胞体积逐渐变大, 形态由梭形逐渐变为多角形或椭圆形, 见图 4。

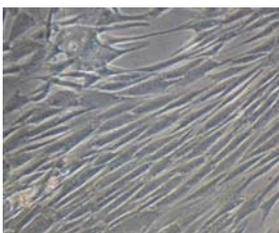


Figure 2 The third passage bone marrow mesenchymal stem cells at 3 d ($\times 400$)
图 2 第 3 代细胞传代第 3 天($\times 400$)

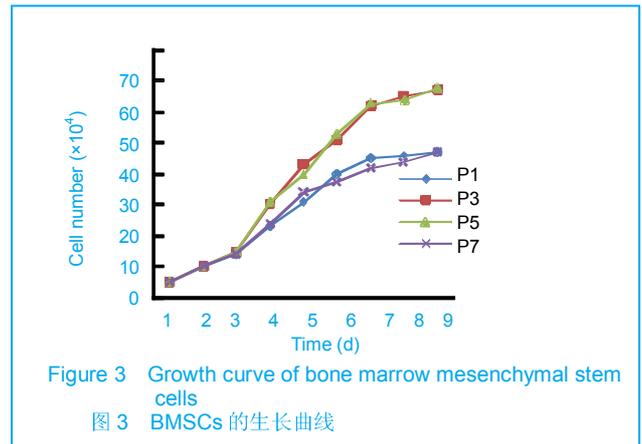


Figure 3 Growth curve of bone marrow mesenchymal stem cells
图 3 BMSCs 的生长曲线



Figure 4 Hyaluronic acid induction 14 d ($\times 100$)
图 4 透明质酸诱导第 14 天($\times 100$)

2.2 甲苯胺蓝染色结果 阴性对照组中仅有极少量细胞甲苯胺蓝染色阳性, 见图 5。实验组和阳性对照组的胞外基质蓝染, 见图 6, 且随着时间的延长, 蓝染程度加深, 但实验组比阳性对照组染色较浅。

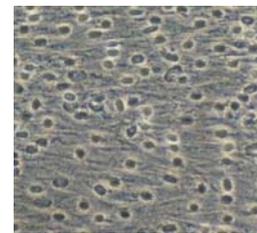


Figure 5 Negative control group (Toluidine blue staining, $\times 200$)
图 5 阴性对照组(甲苯胺蓝染色, $\times 200$)

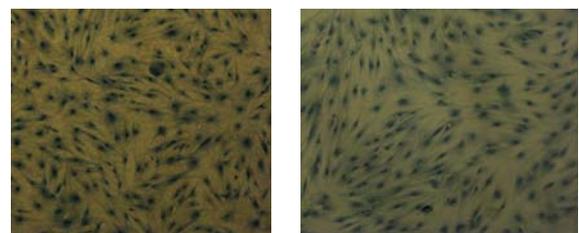
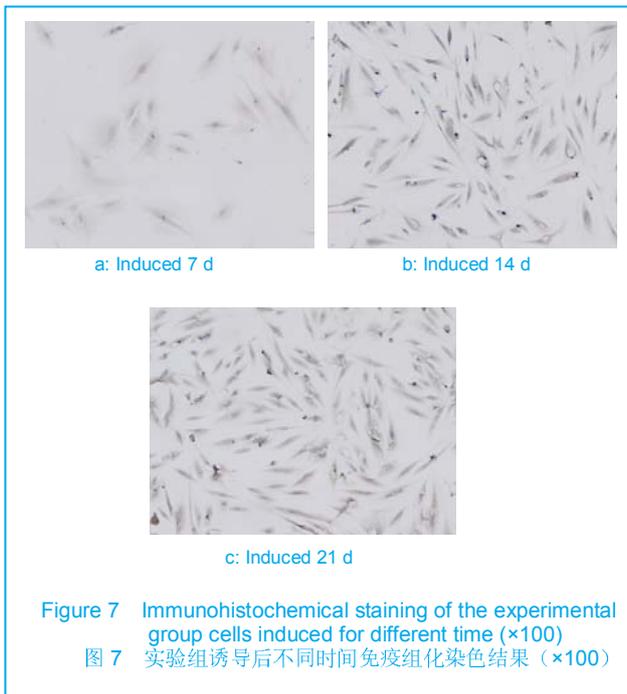


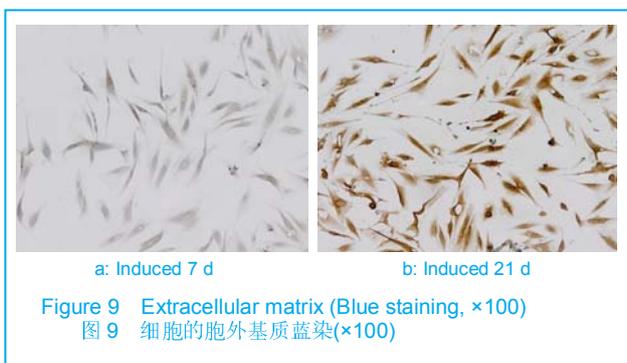
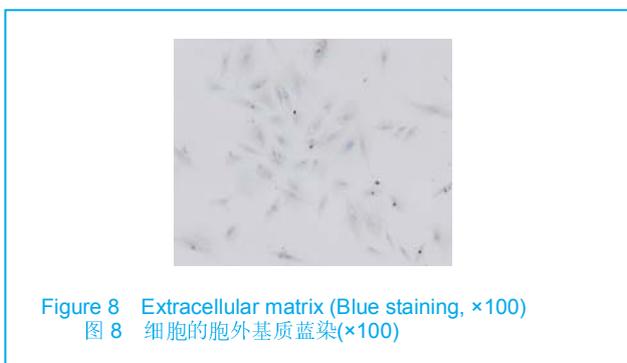
Figure 6 Extracellular matrix (Blue staining, $\times 100$)
图 6 细胞的胞外基质蓝染($\times 100$)

2.3 免疫组织化学染色结果 实验组诱导 7 d 后在细胞密集处有少量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, 见图 7a; 诱导 14 d 以后细胞呈现大

量的棕褐色染色, 但染色较淡, 在细胞密集处细胞周围可见黄褐色染色, 见图7b; 诱导21 d后呈现广泛的棕褐色染色, 染色深而均匀, 见图7c。

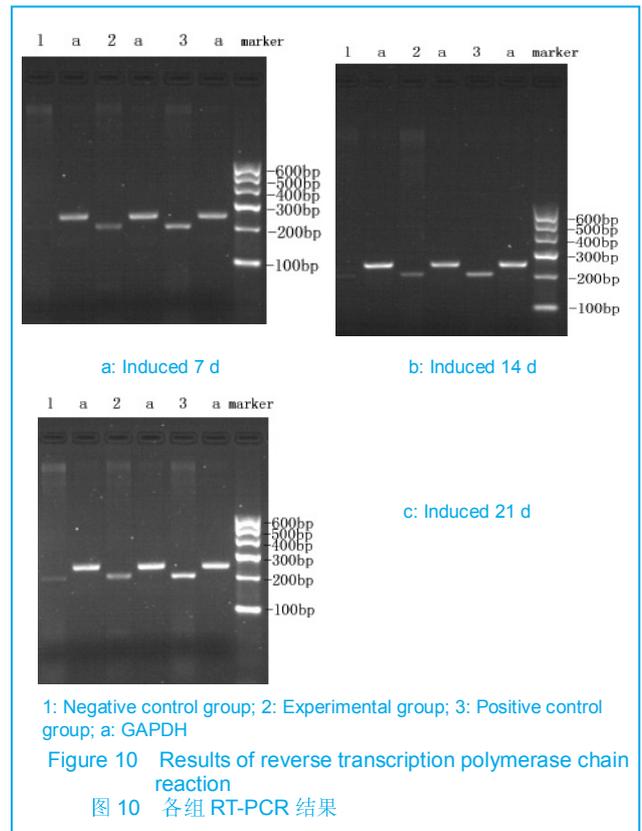


阴性对照组21 d中也有极少量II型胶原免疫组化染色阳性细胞出现, 见图8。与阳性对照组比较, 细胞胞浆均较浅, 见图9。



2.4 RT-PCR结果 提取细胞的总RNA经RT-PCR扩增后, 琼脂糖凝胶电泳见, 7 d时, 实验组与阳性对照组在200~300 bp出现较弱条带, 见图10a。201 bp与预

期产物结果基本相同, 阴性对照组未见表达, 14 d与21 d实验组与阳性对照组均可见明显条带, 图10b, c。阴性对照组仅见极少量表达。



所得数据经统计学分析, 阴性对照组、实验组、阳性对照组mRNA表达水平分别为 13.06 ± 0.46 , 5.83 ± 0.69 , 3.14 ± 1.02 , 各组间比较差异有非常显著性意义 ($P < 0.01$)。

3 讨论

近年来, 应用组织工程学的方法修复关节软骨缺损展示了令人鼓舞的前景。间充质干细胞已成为组织工程软骨构建过程中最常用的种子细胞^[4]。其中BMSCs取材方便、创伤小且易于从骨髓中分离纯化和体外扩增, 不像滑膜、脂肪等来源的间充质干细胞那样原代培养时需要酶消化预处理, 且在三维高密度培养时, 只有BMSCs的软骨分化潜能得到明显提高。因此, BMSCs被认为是用于软骨组织工程学研究最为理想的种子细胞^[5-6]。

BMSCs的分离培养是定向分化实验研究的基础。目前用于分离BMSCs的方法主要有贴壁筛选法、密度梯度离心法和流式细胞仪分离法^[7]。实验通过全骨髓培养+贴壁筛选法分离BMSCs, 这样, 分离培养中出现的杂质血细胞在两三周内随换液被除去。霍建忠等^[8]发现BMSCs原代和第1, 2代细胞性状不纯, 可能混杂有其他类细胞, 而第6代以后BMSCs的成软骨能力降低, 因此最适宜的

软骨组织工程种子细胞应为第3~5代BMSCs。因此, 实验采用生长状态良好的第4代细胞进行实验。另有学者采用微团培养方式来重现胚胎发育过程中的软骨前体状态, 但近来实验发现在微团培养时由于通透性降低, 细胞团块中心营养供应障碍, 细胞增殖反而受限, 因此不能满足较大软骨组织的构建^[9]。与之相比, 本实验采用单层培养模式则不存在上述问题, 诱导后的细胞增殖能力较强, 能够获得较大数量的软骨细胞, 满足大量构建软骨组织工程的需要。

诸多实验表明, 许多细胞因子对体外培养的BMSCs有着强大的诱导分化能力, 其中尤以转化生长因子超家族成员效能最强。转化生长因子 β 是一族多肽类生长因子, 胚胎形成期诱导原始的BMSCs分化形成软骨组织^[10]。转化生长因子 β 异构体 $\beta 2$ 和 $\beta 3$ 比 $\beta 1$ 可更加快速有效地促进BMSCs向软骨方向分化^[11]。实验以转化生长因子 $\beta 3$ 诱导组作为阳性对照, 诱导后细胞甲苯胺蓝染色阳性, 着色深且均匀, II型胶原免疫组化染色21 d时较7 d时明显加深, RT-PCR结果表明II型胶原mRNA高表达, 由此显示了其对BMSCs良好的诱导分化能力。

然而, BMSCs经体外诱导分化构建的软骨细胞移植体一旦脱离严格控制的体外培养环境进入关节腔内, 能否适应关节腔内的理化成分, 国内外仍无文献报道, 尚需进一步研究。

关节内透明质酸主要由软骨细胞和滑膜B细胞分泌, 是关节滑液和软骨基质的重要成分^[12]。具有较强的亲水性和高度黏弹性, 此特性随透明质酸分子量及浓度的不同而变化^[13]。透明质酸、体液、纤维连接素、I型胶原等基质成分构成了胚胎时期BMSCs最初的细胞外环境。以往学者们对透明质酸的研究主要集中于支架材料的构建上^[14]。Johnstone等^[15]联合应用透明质酸和明胶制作了一种坚固而有高孔率的基质材料, 可以观察到BMSCs在其内的软骨细胞分化。而游离的透明质酸本身对BMSCs存在什么样的影响却鲜为人知。

实验应用外源性透明质酸模拟关节腔内的理化环境, 对分离培养的兔BMSCs进行诱导分化, 诱导培养7, 14, 21 d后, 取标本进行甲苯胺蓝染色、II型胶原免疫组化染色及RT-PCR, 结果证实诱导后的BMSCs分泌软骨细胞特征性的细胞外基质: II型胶原和蛋白聚糖, 提示BMSCs已分化为软骨细胞, 且实验组中II型胶原含量远高于阴性对照组。阴性对照组也出现极少量阳性细胞, 可能与血清中未知生长因子作用以及较高细胞密度接种利于BMSCs向软骨细胞方向分化有关。

结果显示, 游离的透明质酸本身也可以诱导BMSCs向成软骨方向分化, 且21 d时软骨细胞的特异性基质II型胶原较7 d时表达明显提高, 但在3个时间点, 外源性透明质酸的诱导分化能力均不如转化生长因子 $\beta 3$ 强。但透明质酸的特性是随透明质酸分子量及浓度的不同而变

化的。Maleski等^[16]的实验也曾一度认为透明质酸对软骨的形成是与其相对分子量和浓度相关, 因此, 不同浓度、不同分子量的透明质酸对体外培养的BMSCs有何影响仍需进一步研究。

4 参考文献

- [1] Liu HW, Chen CH, Tsai CL, et al. Heterobifunctional poly(ethylene glycol)-tethered bone morphogenetic protein-2-stimulated bone marrow mesenchymal stromal cell differentiation and osteogenesis. *Tissue Eng.* 2007;13(5):1113-1124.
- [2] 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.
- [3] Park H, Temenoff JS, Tabata Y, et al. Injectable biodegradable hydrogel composites for rabbit marrow mesenchymal stem cell and growth factor delivery for cartilage tissue engineering. *Biomaterials.* 2007;28(21):3217-3227.
- [4] Tuan RS, Boland G, Tuli R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Res Ther.* 2003;5(1):32-45.
- [5] Abdallah BM, Kassem M. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications. *Gene Ther.* 2008;15(2):109-116.
- [6] Hu RY. Beijing: The Publishing House of People's Health. 2006:168. 胡蕴玉. 现代骨科基础与临床[M]. 北京:人民卫生出版社, 2006:168.
- [7] Beyer Nardi N, da Silva Meirelles L. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. *Handb Exp Pharmacol.* 2006;(174):249-282.
- [8] Huo JZ, Chen ZR. *Zhongguo Linchuang Yixue.* 2005;12(1):104-107. 霍建忠, 陈峥嵘. 细胞传代对骨髓间充质干细胞成软骨细胞分化的影响[J]. *中国临床医学.* 2005;12(1):104-107.
- [9] Duan XJ, Yang L, Zuo ZH. *Zhonghua Shiyuan Waikexue Zazhi.* 2007;24(3):316-318. 段小军, 杨柳, 左镇华等. 应用聚集培养技术进行兔骨髓间充质干细胞体外成软骨诱导培养[J]. *中华实验外科杂志.* 2007;24(3):316-318.
- [10] Roelen BA, Dijke P. Controlling mesenchymal stem cell differentiation by TGF β family members. *J Orthop Sci.* 2003;8(5):740-748.
- [11] Barry F, Boynton RE, Liu B, Murphy JM. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components. *Exp Cell Res.* 2001;268(2):189-200.
- [12] Yang XL, Liu M. *Zhongguo Tengong Yixue Zazhi.* 2006;12(1):47-49. 杨小立, 刘淼. 透明质酸与骨关节炎的研究进展[J]. *中国疼痛医学杂志.* 2006;12(1):47-49.
- [13] Grigolo B, Lisignoli G, Desando G, et al. Osteoarthritis treated with mesenchymal stem cells on hyaluronan-based scaffold in rabbit. *Tissue Eng Part C Methods.* 2009;15(4):647-658.
- [14] Wang CT, Lin YT, Chiang BL, et al. High molecular weight hyaluronic acid down-regulates the gene expression of osteoarthritis-associated cytokines and enzymes in fibroblast-like synoviocytes from patients with early osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2006;14(12):1237-1247.
- [15] Johnstone B, Yoo JU. Autologous mesenchymal progenitor cells in articular cartilage repair. *Clin Orthop Relat Res.* 1999;(367 Suppl):S156-162.
- [16] Maleski MP, Knudson CB. Hyaluronan-mediated aggregation of limb bud mesenchyme and mesenchymal condensation during chondrogenesis. *Exp Cell Res.* 1996;225(1):55-66.

来自本文课题的更多信息一

基金资助: 山东省自然科学基金项目(Y2006C19), 课题名称: 透明质酸影响骨髓间充质干细胞体外分化的研究。

作者贡献: 第一、二、三作者进行实验设计, 第一作者进行实施, 第二、三作者进行实验评估, 资料收集为第一、二作者, 第一作者成文, 第二、三作者审核, 第一、二、三作者对文章负责。

致谢: 感谢王英振教授、王昌耀老师对实验的指导与支持, 感谢青岛大学医学院中心实验室的老师们和同学们对实验的帮助。

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。