

完全脱钙骨基质与骨髓间充质干细胞体外诱导构建组织工程纤维软骨**

王 鹏, 崔一民, 陈晓东

In vitro fibrocartilage construction with bone marrow-derived mesenchymal stem cells-fully demineralized bone matrix

Wang Peng, Cui Yi-min, Chen Xiao-dong

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

Wang Peng★, Studying for master's degree, Department of Orthopaedics, Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200092, China shikaiyulu371325@163.com

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

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

Received: 2010-09-13
Accepted: 2010-10-19

Abstract

BACKGROUND: The fully demineralized bone matrix containing bone morphogenetic protein can induce bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSCs) differentiate into cartilage cells, and keep it characteristics of cartilage cells. It plays an important role in the process of chondrogenesis.

OBJECTIVE: To observe the complexes of BMSCs and fully demineralized bone matrix induced into the cartilage tissue *in vitro* and to detect the effects on cell apoptosis of culture system and scaffold materials.

METHODS: Porcine BMSCs were isolated with whole bone marrow culture method. The first passage of BMSCs were seeded onto the fully demineralized bone matrix. The BMSCs-fully demineralized bone matrix complex was incubated in inductive medium (high glucose DMEM including transforming growth factor- β 1, insulin-like growth factor-1, dexamethasone, ascorbic acid and 10% fetal bovine serum) for chondrogenic differentiation, serving as experimental group. The monolayer induced BMSCs, monolayer basic cultured BMSCs and the fully demineralized bone matrix cultured with inductive medium were the control groups. Samples were harvested at week 1, 2, 3 and 4 after culture respectively to observe general morphology. Collagen type I, II and Aggrecan could be observed by reverse-transcription polymerase chain reaction. The cell apoptosis was detected at 4 weeks.

RESULTS AND CONCLUSION: The continuous expression of collagen type I, and the increased expression of collagen type II and Aggrecan could be detected in experimental group and monolayer induced BMSCs group. But the expression in experimental group was higher than that of monolayer induced BMSCs group. The apoptosis of experimental group was higher than monolayer induced BMSCs and monolayer basic cultured BMSCs. The complex of porcine BMSCs and fully demineralized bone matrix could be induced to express cartilage matrix *in vitro* with transforming growth factor- β 1 and insulin-like growth factor-1. The expression of extracellular matrix in three-dimensional culture was much higher than that in the monolayer; the static culture systems may influence the apoptosis of BMSCs cultured in three-dimensional environment.

Wang P, Cui YM, Chen XD. *In vitro* fibrocartilage construction with bone marrow-derived mesenchymal stem cells-fully demineralized bone matrix. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(8):1350-1354. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 含有骨形态发生蛋白的完全脱钙骨基质可使骨髓间充质干细胞向软骨细胞分化并维持其软骨细胞的特性, 在软骨发生过程中发挥重要作用。

目的: 将骨髓间充质干细胞与完全脱钙骨基质在体外诱导培养成纤维软骨组织以及观察培养体系与支架材料对细胞凋亡的影响。

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1代骨髓间充质干细胞均匀接种到完全脱钙骨基质上, 以含有转化生长因子 β 1、胰岛素样生长因子、地塞米松、抗坏血酸及体积分数10%FBS的高糖DMEM诱导培养液培养作为实验组, 将单层诱导培养、单层基础培养的骨髓间充质干细胞、空白完全脱钙骨基质作为对照, 于培养第1, 2, 3, 4周进行大体形态观察以及I、II型胶原及聚集蛋白聚糖的RT-PCR定性检测; 培养4周进行细胞凋亡检测。

结果与结论: 实验组可检测到I型胶原的持续表达, II型胶原及聚集蛋白聚糖表达逐渐增加。单层诱导培养组可检测到II型胶原、聚集蛋白聚糖的表达及I型胶原的持续表达, 但表达量远低于实验组; 实验组细胞凋亡率高于单层诱导培养组、单层基础培养组。说明转化生长因子 β 1、胰岛素样生长因子1体外诱导培养的骨髓间充质干细胞-完全脱钙骨基质可以表达特异性软骨基质, 三维环境培养细胞外基质的表达量明显高于单层诱导培养; 静态培养系统对三维培养的细胞凋亡有影响。

关键词: 完全脱钙骨; 骨髓间充质干细胞; 诱导; 分化; 组织工程软骨; 凋亡

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.08.005

王鹏, 崔一民, 陈晓东. 完全脱钙骨基质与骨髓间充质干细胞体外诱导构建组织工程纤维软骨[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(8):1350-1354. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

随着人们对半月板切除后发生骨性关节炎认识的加深, 为尽可能避免膝关节骨性关节炎的发生, 应用组织工程技术构建纤维软骨组织已成为修复半月板的一种较好的思路^[1]。在组织

工程技术中, 有许多基本的生物学因素需要解决, 这主要包括种子细胞的来源、支架材料的选择、生物反应器的设计和培养的环境等, 而种子细胞与支架材料则是半月板组织工程修复中最主要的两个因素^[2]。随着研究的不断进步, 骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)逐渐成为一种较为成熟的软骨

组织工程种子细胞。用于组织工程的生物支架材料主要分为两类,一类是人工合成的支架材料,如聚乙醇酸、聚氨酯类等;另一类是天然生物支架材料,如胶原蛋白、纤维蛋白胶、天然脱细胞生物基质等。不同种类支架材料的性能也不断的探索中,一种理想的支架材料应该具有良好的孔隙率、生物力学性能以及生物相容性。本实验将BMSCs均匀种植到完全脱钙骨基质中,在体外诱导培养并观察软骨特异性基质表达情况,并且观察培养体系与支架材料对细胞凋亡的影响。

1 材料和方法

设计: 成组设计,形态学观察,分子生物学检测,细胞凋亡检测。

时间及地点: 于2009-06/2010-03在上海交通大学医学院附属新华医院科研中心完成。

材料: 5 d龄长枫杂交猪5只,体质量约10 kg,雌雄不拘,由上海市南汇县老港镇特种养殖场提供。完全脱钙骨基质由上海组织工程研究与开发中心研制。

主要试剂与仪器:

试剂与仪器	来源
DMEM 培养液、胎牛血清	Gibco 公司
0.25%胰蛋白酶+0.02%EDTA	Gibco 公司
转化生长因子 β 1	PeptoTech 公司
胰岛素样生长因子 1	PeptoTech 公司
地塞米松、抗坏血酸	Sigma 公司
Trizol 试剂	Invitrogen 公司
TUNEL 检测液	碧云天公司
激光共聚焦显微镜	Olympus 公司
RT 试剂盒、PCR 反应试剂盒	Takara 公司

实验方法:

BMSCs分离培养: 将猪以氯胺酮(2 mg/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肝素化无血清低糖DMEM培养液的50 mL无菌离心管中,混匀制成细胞悬液。参照全骨髓培养法^[3-4],将细胞悬液以1 500 r/min离心8 min,弃上清和脂肪团,无血清的DMEM培养液重悬洗涤离心3次,有核细胞计数 $1 \times 10^{10} \text{ L}^{-1}$,加入低糖DMEM基础培养液(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),置于100 mm培养皿中,放入37 °C、体积分数5% CO₂培养箱中培养。细胞接种第5天首次

换液,去除未贴壁细胞,以后每3 d换液1次,传代以0.25%胰蛋白酶+0.02% EDTA消化,含血清的DMEM终止。

BMSCs-完全脱钙骨基质复合物的制备: 取完全脱钙骨基质,PBS冲洗3次,吸干水分,置于培养皿中,紫外照射30 min备用。调整第1代BMSCs细胞浓度约 $1 \times 10^{10} \text{ L}^{-1}$,将细胞悬液滴加到完全脱钙骨基质上并将其完全覆盖,放入37 °C摇床以80次/min振荡过夜,然后实验组加入诱导培养液高糖DMEM(含体积分数10%FBS、转化生长因子 β 1 10 $\mu\text{g/L}$ 、胰岛素样生长因子1 50 $\mu\text{g/L}$ 、地塞米松40 $\mu\text{g/L}$ 、抗坏血酸50 g/L、青霉素100 U/mL、链霉素100 g/L),培养液液面覆盖BMSCs-完全脱钙骨基质复合物,将其放入37 °C、体积分数5%CO₂、100%湿度培养箱中培养。对照组:单层诱导培养组,加入诱导培养液高糖DMEM(含体积分数10%FBS、转化生长因子 β 1 10 $\mu\text{g/L}$ 、胰岛素样生长因子1 50 $\mu\text{g/L}$ 、地塞米松40 $\mu\text{g/L}$ 、抗坏血酸50 g/L、青霉素100 U/mL、链霉素100 g/L),单层基础培养组,加入低糖DMEM基础培养液(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);完全脱钙骨基质作为空白对照组;每3 d换液1次,培养4周,分别在第1, 2, 3, 4周进行大体形态观察和取材。

Trizol-氯仿法RNA抽提: 先将取材样本剪切成小块,取大约80 mg样本液氮冷冻,在低温下用研钵研碎,放入玻璃匀浆器中加入1 mL Trizol试剂匀浆样品,将其转移到1.5 mL EP管中室温静置5 min;加入0.2 mL三氯甲烷,剧烈摇匀15 s后放置2.0~3.0 min,4 °C下以12 000 r/min离心15 min;小心吸取上清400 μL ,加入500 μL 异丙醇放置10 min,4 °C下以12 000 r/min离心10 min;体积分数75%乙醇洗涤,4 °C下以12 000 r/min离心5 min;弃上清,自然干燥约5 min,加入40 μL DEPC水溶解RNA沉淀,分光光度计检测A_{260/280}比值。

RT-PCR检测: 培养第1~4周的样本以Trizol-氯仿法抽提总RNA,反转录为cDNA,I、II型胶原与聚集蛋白聚糖为检测目的基因, β -actin作为内参基因;冰上配制PCR反应体系,PCR反应以95 °C预变性2 min,95 °C变性1 min,退火1 min,72 °C延伸1 min;反应35个循环。PCR反应产物在1.5%琼脂糖凝胶上电泳,记录电泳结果定性检测I、II胶原蛋白与聚集蛋白聚糖的表达。PCR引物序列见表1。

上海交通大学医学院附属新华医院骨科,上海市200092

王鹏★,男,1984年生,山东省临沂市人,汉族,上海交通大学医学院附属新华医院在读硕士,主要从事半月板组织工程的研究。
shikaiyulu371325@163.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:B
文章编号:1673-8225
(2011)08-01350-05

收稿日期:2010-09-13
修回日期:2010-10-19
(20100817005/GW
·Y)

表 1 RT-PCR 引物序列
Table 1 Reverse-transcription polymerase chain reaction primers

Gene	Upstream primer	
COL1A1	CTG GTG ATG CTG GTC CTG TTG	
COL2A1	TCC CCG GCA CTC CTG GCA CTG AT	
Aggrecan	CCT CAG GAC TTC CAG AAG TT	
GAPDH	CTG CCC CTT CTG CTG ATG CC	
Caspase-3	GAA CTC TAA CTG GCAAAC CCAAA	
β -actin	GGA CTT CGA GCA GGA GAT GG	
Gene	Downstream primer	Annealing temperature (°C)
COL1A1	CCT TGG GGT TCT TGC TGA TGT	57
COL2A1	CTT GGG CAC CTC GGG CTC CTT TAG	55
Aggrecan	ACT GGT GGT GGT GGA TTC TC	55
GAPDH	CAT CAC GCC ACA GTT TCC CA	57
Caspase-3	GTC CCA CTG TCC GTC TCAATC	60
β -actin	AGG AAG GAG GGC TGG AAG AG	60

TUNEL检测细胞凋亡: 对照组制作细胞爬片, 实验组制作冰冻切片, 40 g/L多聚甲醛固定60 min; PBS洗涤2次, 每次10 min; 加入含0.1% Triton X-100的PBS, 冰浴孵育2 min; PBS洗涤2次, 加入50 μ L TUNEL检测液, 37 °C避光孵育60 min; PBS洗涤3次后加入PI(碘化丙啶)避光孵育5 min; 抗荧光淬灭封片液封固后在激光共聚焦显微镜下观察细胞凋亡状况, 激发波长488 nm, 发射波长530 nm。激光共聚焦显微镜下随机取8个视野, TUNEL检测计数, PI荧光染核为蓝色荧光, TUNEL检测液染核为绿色荧光; 其中标记蓝色荧光(+)绿色荧光(-)为正常细胞; 蓝色荧光(+)绿色荧光(+)为坏死或凋亡细胞; 计数标记为蓝色荧光(+)绿色荧光(+)的细胞核后, 进行统计学分析。

Real-time PCR检测凋亡基因Caspase-3: 培养4周的各组样本抽提总RNA反转录成cDNA, 荧光定量PCR检测目的基因Caspase-3表达, β -actin作为内参基因, 冰上配制荧光定量PCR反应液, 反应以95 °C预变性30 s, 95 °C变性5 s, 60 °C 34 s, 反应40个循环。引物序列见表1。

主要观察指标: ①细胞支架复合物大体形态及倒置显微镜下形态。②细胞外基质的PCR检测。③TUNEL细胞凋亡检测。④Real-time PCR检测凋亡基因Caspase-3表达。

统计学分析: 由第一作者采用SPSS 13.0统计软件分析处理, 检测数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 行组间配对t检验, $P < 0.05$ 则认为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 BMSCs形态学观察 BMSCs形态呈现纺锤形, 旋涡状排列, 诱导后的BMSCs聚集成簇生长, 形态多

不规则, 见图1, 2。



Figure 1 Bone marrow-derived mesenchymal stem cells showed spindle-like shape (Inverted microscope, $\times 40$)
图1 骨髓间充质干细胞的形态呈长梭形(倒置显微镜, $\times 40$)



Figure 2 Induced bone marrow-derived mesenchymal stem cells were irregular and grew in cluster (Inverted microscope, $\times 40$)
图2 诱导的骨髓间充质干细胞形态不规则, 聚集生长(倒置显微镜, $\times 40$)

BMSCs-完全脱钙骨基质复合物于倒置显微镜下观察, 可见细胞紧密地贴附于支架上, 形态多为长梭形、椭圆形不等, 见图3, 4。

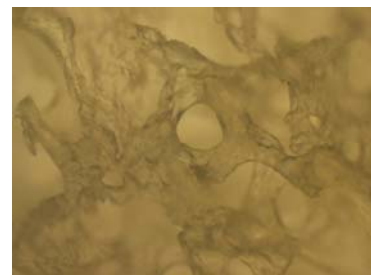


Figure 3 Pore characteristics of fully demineralized bone matrix (Inverted microscope, $\times 200$)
图3 完全脱钙骨基质的孔隙特征(倒置显微镜, $\times 200$)

大体形态观察, 完全脱钙骨基质显示细胞支架复合物在培养4周后体积略缩减, 中央部位略呈现凹陷, 样本大体呈半透明状, 颜色微白, 镊子施压显示有一定弹性, 复合物表面略不平整。

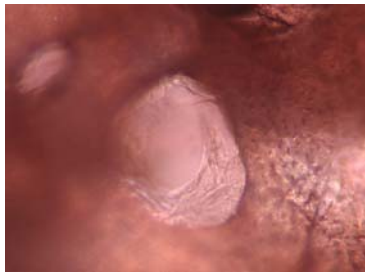
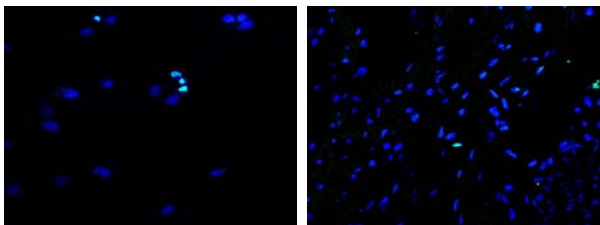


Figure 4 Induced bone marrow-derived mesenchymal stem cells-fully demineralized bone matrix complex closely attached on the scaffolds (Inverted microscope, $\times 400$)

图4 观察诱导后的骨髓间充质干细胞-完全脱钙骨基质复合物见细胞紧密贴附于支架上(倒置显微镜, $\times 400$)

2.2 RT-PCR定性检测结果 实验组可以检测到I型胶原的持续表达,并且II型胶原的表达量随着诱导时间的变化而增加,第1周表达量相对较低,到第3周左右达到高峰;聚集蛋白聚糖表达量随着时间不断增加,大约诱导4周表达量最高。单层诱导培养可以检测到II型胶原和聚集蛋白聚糖的表达,细胞外基质表达量均明显少于实验组。单层基础培养可检测到I型胶原的持续表达,然而未能检测到II型胶原及聚集蛋白聚糖表达。空白对照组未能检测到细胞外基质的表达。

2.3 TUNEL细胞凋亡检测结果 见图5。



a: Monolayer induced culture group vs. experiment group

b: Monolayer basic culture group vs. monolayer induced culture group

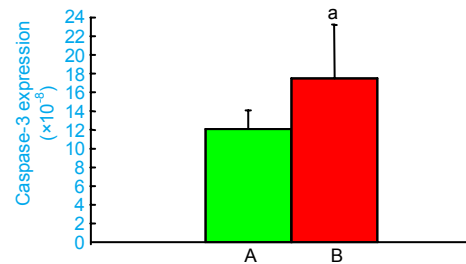
Figure 5 TUNEL apoptosis results observed by laser confocal microscope, cell nucleus labeling as PI(+) and TUNEL(+) were apoptotic cells and necrotic cells with pycnosis and pyrolysis ($\times 40$)

图5 激光共聚焦显微镜下观察 TUNEL 检测细胞凋亡,标记为 PI(+), TUNEL(+)的细胞核为核固缩或核裂解的坏死凋亡细胞($\times 40$)

单层诱导培养组检测凋亡率为(16.10 \pm 8.29)%,单层基础培养为(12.64 \pm 5.52)%,组间差异无显著性意义($P=0.245$ 3);实验组冰冻切片TUNEL检测显示凋亡率为(33.00 \pm 7.78)%,单层诱导培养组与实验组凋亡率差异有显著性意义($P=0.015$ 6)。

2.4 Caspase-3定量检测结果 取标准品作5个梯度稀释,检测目的基因与内参基因的Ct值, $\Delta Ct=Ct$ 目的基因-Ct内参基因,作相对定量标准曲线,检测目的基因与内参基因的扩增效率具有可比性;荧光定量PCR检测结果显示,诱导4周实验组与单层诱导培养组比较差异有

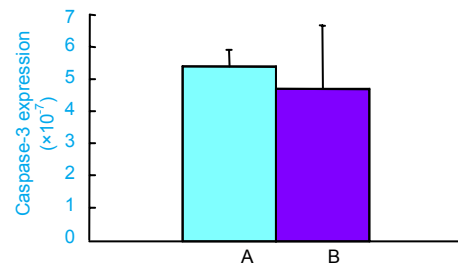
显著性意义($P=0.02$),实验组Caspase-3的表达量约为单层诱导培养组的3.29倍;单层诱导培养在于Caspase-3表达量与单层基础培养组比较无差异。见图6。



A: Monolayer induced culture group; B: Experiment group

^a $P < 0.05$, vs. monolayer induced culture group

a: Monolayer induced culture group vs. experiment group



A: Monolayer basic culture group; B: Monolayer induced culture group

b: Monolayer basic culture group vs. monolayer induced culture group

Figure 6 Caspase-3 quantitative detections

图6 各组 Caspase-3 定量检测结果

3 讨论

BMSCs具有良好的增殖能力,在体外可获得大量的细胞以供使用,经过软骨定向诱导后可以表达软骨特异性的基质成分。BMSCs是软骨组织工程一种重要的种子细胞,具有以下优点:①取材方便,对供体损伤小。②可取自体骨髓,避免免疫排斥反应的发生。③BMSCs有很强的增殖能力,与成熟细胞体外培养后易老化及功能丧失形成鲜明对照^[5]。转化生长因子 $\beta 1$ 与胰岛素样生长因子1作用于BMSCs,可以促进其成软骨分化,并且抑制其成骨分化^[6]。有研究显示胰岛素样生长因子1可以刺激细胞增殖、诱导软骨细胞外基质分泌、调节细胞凋亡,而转化生长因子 $\beta 1$ 与胰岛素样生长因子1同时应用时会对细胞外基质的分泌产生协同效应^[7]。完全脱钙骨基质中含有的骨形态发生蛋白能够使BMSCs向软骨细胞分化并维持其软骨细胞的特性,在软骨发生过程中起重要作用^[8]。

作为组织工程的支架材料应该有较高的孔隙率,较好的组织相容性以及较好的生物力学性能^[9]。实验结果显示完全脱钙骨基质为多孔的海绵样结构,孔隙较高,可

提供宽大的内表面积和空间, 利于细胞的黏附和生长; 其拥有良好的材料-细胞界面, 粗糙的表面和裸露的孔穴有利于细胞黏附固定。镜下观察可见细胞良好地贴附于支架上, 显示出良好的生物相容性。

细胞凋亡是一种主动的、生理性的细胞死亡方式, 在维持组织稳定中起很大的作用。本实验分别通过TUNEL检测方法与荧光定量PCR方法检测凋亡表达。目前已有13种Caspase成员被先后发现或克隆, 其中6种Caspase与细胞凋亡有关, 根据这些Caspase的作用不同分为两类: 启动型(Caspase-8, 9, 10)和执行型(Caspase-3, 6, 7)。Caspase可能存在细胞外和细胞内两条激活途径, 每条途径都有各自对应的Caspase^[7]。现在一般认为Caspase-3是细胞凋亡过程中最主要的终末剪切酶, 也是细胞杀伤机制的重要组成部分。TUNEL法及荧光定量PCR检测Caspase-3结果发现同一时间诱导培养的细胞与未诱导组在细胞凋亡表达上无统计学差异。诱导培养基中的Vit C是胶原物质合成所必须的原料, 可以促进软骨细胞的生长; 地塞米松能够提高靶细胞对于生长因子的敏感性, 从而促进BMSCs向软骨细胞分化, 然而地塞米松同时可以促进细胞凋亡; 诱导系统中的细胞因子转化生长因子 β 1与胰岛素样生长因子1都可以抑制软骨细胞的凋亡; D'Lima等^[10]发现50 μ g/L胰岛素样生长因子1能抑制诱导的软骨细胞凋亡; 胰岛素样生长因子1剂量达50 μ g/L时, 细胞的增殖活性达最高值, 并且能抑制白细胞介素1诱导的软骨细胞凋亡^[11]。

在脱钙骨上诱导的细胞与在培养皿单层诱导细胞相比较, 其凋亡表达相对较高。有研究表明, 营养途径被阻断的情况下软骨细胞可以出现明显的凋亡^[12]。在静态培养系统下脱钙骨基质中央部位的贴附细胞与外界营养及代谢尾产物交换的途径存在障碍, 可伴有细胞代谢功能紊乱及异常的基因表达, 从而可能引起细胞凋亡的增加。

完全脱钙骨基质作为软骨诱导基质仍然存在一些问题, 实验中细胞与完全脱钙骨基质的黏附与生长与单层细胞培养接近, 可能会在一定程度上影响软骨组织的形成, 另外, 完全脱钙骨基质中的骨形态发生蛋白具有诱导BMSCs向软骨分化的特性, 同时骨形态发生蛋白还具有诱导细胞向成骨方向分化的潜能, 这就使诱导系统存在一定的不确定性, 即向成骨方向分化的可能, 在本实验中诱导培养使用转化生长因子 β 1与胰岛素样生长因子1联合诱导细胞向软骨方向分化, 其可抑制骨形态发生蛋白的成骨分化潜能, 维持BMSCs持续向软骨方向分化, 该实验结果也显示了较好的软骨基质的表达。

本实验证实了完全脱钙骨基质作为组织工程纤维软骨支架材料具有一定的可行性, BMSCs作为一种较成熟的种子细胞, 在本实验的诱导体系下可以较好地纤维软骨细胞分化, 并且对其凋亡不会产生负面影响。半月板组织主要是由纤维软骨细胞构成的。在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, 且半月板时刻处于不同的应力环境中^[13], 在体外的环境下尚难以完全模拟出半月板的生长条件, 现有条件尚无法较好的构建出半月板组织结构。体外静态的培养对细胞凋亡会产生一定的影响, 尚存在较大的缺陷, 能够模拟体内应力环境的生物反应器是在体外培养组织工程半月板的一个发展方向, 也是未来组织工程研究的一个发展方向。

4 参考文献

- [1] Li RH, Zhou XL. Zhongguo Laonianxue Zazhi. 2008, 28(21):2180-2184. 李荣亨, 周小莉. 软骨细胞凋亡的信号转导[J]. 中国老年学杂志, 2008, 28(21):2180-2184.
- [2] Tan Y, Zhang Y, Pei M. Meniscus reconstruction through coculturing meniscus cells with synovium-derived stem cells on small intestine submucosa—a pilot study to engineer meniscus tissue constructs. Tissue Eng Part A. 2010; 16(1):67-79.
- [3] Friedenstein A J, 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.
- [4] 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.
- [5] Kojima K, Ignatz RA, Kushibiki T, et al. Tissue-engineered trachea from sheep marrow stromal cells with transforming growth factor beta2 released from biodegradable microspheres in a nude rat recipient. J Thorac Cardiovasc Surg. 2004; 128(1):147-153.
- [6] Yin ZH, Liu M, Wang JT. Isolation and induction of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells to express chondrocytic phenotype. Xian Jiaotong Daxue Xuebao. 2002; 14(2):147-150.
- [7] Longobardi L, O'Rear L, Aakula S, et al. Effect of IGF-I in the chondrogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells in the presence or absence of TGF-beta signaling. J Bone Miner Res. 2006; 21(4):626-636.
- [8] Gooch KJ, Blunk T, Courter DL, et al. Bone morphogenetic proteins-2, -12, and -13 modulate in vitro development of engineered cartilage. Tissue Eng. 2002; 8(4):591-601.
- [9] van Tienen TG, Hannink G, et al. Meniscus replacement using synthetic materials. Clin Sports Med. 2009; 28(1):143-156.
- [10] D'Lima DD, Hashimoto S, Chen PC, et al. Prevention of chondrocyte apoptosis. J Bone Joint Surg Am. 2001; 83-A Suppl 2(Pt 1):25-26.
- [11] Fan XP, Li JH, Huang JR. Zhongguo Linchuang Kangfu. 2003; 7(23):3160-3161. 樊雪萍, 李建华, 黄建荣. 胰岛素样生长因子-I对软骨细胞凋亡的抑制[J]. 中国临床康复, 2003, 7(23):3160-3161.
- [12] Xu LZ, Chen XW, Lu LM, et al. Wannan Yixueyuan Xuebao. 2008; 27(1):31-33. 徐宏光, 陈学武, 卢林明, 等. 阻断软骨终板营养对终板软骨细胞影响的实验研究[J]. 皖南医学院学报, 2008, 27(1):31-33.
- [13] Sweigart MA, Athanasiou KA. Tensile and compressive properties of the medial rabbit meniscus. Proc Inst Mech Eng H. 2005; 219(5):337-347.

来自本文课题的更多信息一

基金资助: 上海市教育委员会科研创新项目(08YZ37), 课题名称: 压应力对构建半月板代谢及生物力学的影响。

作者贡献: 第一作者进行实验设计, 实验实施为第一作者, 实验评估为第二、三作者, 第一作者负责资料收集并成文, 第二、三作者负责审核工作, 第一、三作者对文章负责。

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。

伦理批准: 实验过程中对动物处置符合动物伦理学标准

本文创新性: 以“骨髓间充质干细胞, 完全脱钙骨, 诱导, 分化”为关键词检索2006-01/2010-07中文期刊全文数据库文章。采用同种异体完全脱钙骨基质作为组织工程纤维软骨的支架材料, 骨髓间充质干细胞作为纤维软骨诱导的种子细胞, 在体外诱导培养, 来观察其软骨表达及凋亡, 评价该材料作为组织工程纤维软骨支架材料的可行性, 为组织工程支架材料提供了新的思路。