

大鼠骨髓间充质干细胞的体外成骨诱导**

赵大成, 汪玉良, 党跃修, 赵琳, 汪静, 王翠芳

In vitro osteogenic induction of rat bone marrow mesenchymal stem cells

Zhao Da-cheng, Wang Yu-liang, Dang Yue-xiu, Zhao Lin, Wang Jing, Wang Cui-fang

Abstract

BACKGROUND: Bone marrow mesenchymal stem cells are a kind of good seed cells. Bone marrow mesenchymal stem cells compounded onto biological scaffold for treatment of bone defects have acquired satisfactory outcomes and become a gradually increasing research area.

OBJECTIVE: To investigate the effect of *in vitro* osteogenic induction of rat bone marrow mesenchymal stem cells.

METHODS: Sprague-Dawley rat bone marrow mesenchymal stem cells were *in vitro* isolated by adherent method. Passage 3 well growing bone marrow mesenchymal stem cells were divided into two groups. The control group was cultured only with DMEM/F12 culture medium. The experimental group was cultured with DMEM/F12 culture medium containing osteogenic inductor.

RESULTS AND CONCLUSION: Primary bone marrow mesenchymal stem cells cultured by the whole bone marrow adherence method exhibited a shuttle-shaped or polygon-shaped appearance. After induced by osteogenic inductor, bone marrow mesenchymal stem cells adhered to plate wall in a circle or oval-shaped manner. Alkaline phosphatase activity was significantly higher in the experimental group than in the control group ($P < 0.01$). Calcified nodules appeared after alizarin red staining. Western blotting results showed that type I collagen protein expression was significantly higher in the experimental group than in the control group ($P < 0.01$). ELISA quantitative analysis showed that osteocalcin was significantly higher in the experimental group than in the control group ($P < 0.01$). These findings suggest that whole bone marrow adherence method for culture of bone marrow mesenchymal stem cells is simple and practical and the cultured cells exhibit morphological and biological characteristics of osteoblasts after osteogenic induction.

Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730030, Gansu Province, China

Zhao Da-cheng★, Studying for master's degree, Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730030, Gansu Province, China zhaodacheng09@163.com

Corresponding author: Wang Yu-liang, Master's supervisor, Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730030, Gansu Province, China wyl60918@sina.com

Supported by: the Natural Science Foundation of Gansu Province, No. 096RJZA077*

Received: 2011-10-04
Accepted: 2012-03-01

Zhao DC, Wang YL, Dang YX, Zhao L, Wang J, Wang CF. In vitro osteogenic induction of rat bone marrow mesenchymal stem cells. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(14): 2491-2495. [http://www.crtor.cn http://en.zgckf.com]

摘要

背景: 骨髓间充质干细胞作为良好的种子细胞, 将其复合于生物支架治疗骨缺损取得了良好的进展, 是当今研究的一大热点。

目的: 观察大鼠骨髓间充质干细胞体外诱导向成骨样细胞分化的效果。

方法: 采用贴壁筛选法分离培养 SD 大鼠骨髓间充质干细胞, 取生长状态良好的第 3 代骨髓间充质干细胞, 分为 2 组, 对照组细胞仅用 DMEM/F12 培养基培养; 实验组以含成骨诱导剂的 DMEM/F12 培养基培养。

结果与结论: 全骨髓贴壁法培养的原代骨髓间充质干细胞呈梭形或多角形贴壁生长; 经成骨诱导剂诱导后骨髓间充质干细胞呈圆形或卵圆形贴壁生长, 碱性磷酸酶活性明显强于对照组 ($P < 0.01$); 茜素红染色出现阳性的钙化结节; Western blotting 检测 I 型胶原蛋白表达较对照组有明显增加 ($P < 0.01$); 骨钙素 ELISA 定量分析较对照组明显升高 ($P < 0.01$)。提示全骨髓贴壁法培养骨髓间充质干细胞方法简单、实用, 所培养的骨髓间充质干细胞在成骨诱导后表现了成骨细胞的形态学和生物学特性。

关键词: 成骨细胞; 骨髓间充质干细胞; 诱导; 形态; 培养

缩略语注释: BMSCs: bone marrow mesenchymal stem cells, 骨髓间充质干细胞

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.14.005

赵大成, 汪玉良, 党跃修, 赵琳, 汪静, 王翠芳. 大鼠骨髓间充质干细胞的体外成骨诱导[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(14):2491-2495. [http://www.crtor.org http://cn.zgckf.com]

0 引言

骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 增殖活跃, 且具有多向分化潜能, 在不同的诱导条件下, 能向成骨细胞、成软骨细胞、脂肪细胞、神经细胞等中胚层及神经外胚层组织细胞分化^[1]。因此, BMSCs 是良好的组织工程种子细胞。已有报道把 BMSCs 复合于生物支架材料治疗骨缺

损^[2]。选择合适的诱导途径获得成骨性能良好的目的细胞是组织工程研究重点之一。实验采用全骨髓贴壁法分离、扩增大鼠 BMSCs, 将其在体外诱导向成骨细胞分化, 检测其成骨活性, 为下一步行 BMSCs 移植研究打下基础。

1 材料和方法

设计: 随机对照细胞学实验。

时间及地点: 实验于 2010-05/09 在甘肃省

兰州大学第二医院, 甘肃省兰州市 730030

赵大成★, 男, 1984年生, 甘肃省定西市人, 汉族, 兰州大学第二医院在读硕士, 主要从事骨科的研究。
zhaodacheng09@163.com

通讯作者: 汪玉良, 硕士生导师, 骨科副主任, 兰州大学第二医院骨科, 甘肃省兰州市 730020
wyl60918@sina.com

中图分类号: R394.2
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225 (2012)14-02491-05

收稿日期: 2011-10-04
修回日期: 2012-03-01
(20110504012/WL-S)

骨关节疾病研究重点实验室完成。

材料:

实验动物: 3月龄雄性SD大鼠, 体质量140~160 g, 购自甘肃中医学院实验动物中心, 动物质量合格证号: SCXK甘2004-0006-152。

主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
DMEM/F12 培养基和胰蛋白酶	Gibco 公司
胎牛血清	杭州四季青公司
青/链霉素	哈药六厂
硝酸银、硫代硫酸钠	上海无机化学试剂厂
EDTA、多聚甲醛	国营重庆无机化学试剂厂
地塞米松、 β -甘油磷酸钠、磷酸化的 VC	Sigma 公司
碱性磷酸酶活性检测试剂盒	南京建成生物工程研究所
I 型胶原蛋白和 β -Actin 一抗	Abcam 公司
二抗	北京中杉金桥生物公司
骨钙素 ELISA 检测试剂盒	IDS HTC 公司
塑料培养皿(直径=60 mm)、塑料培养板	美国 Corning 公司
IX70 倒置相差显微镜	Olympus 公司, 日本
IBX51 IGO 750 细胞培养箱	Thermo Electron Corporation 公司, 美国
电泳仪、电转移仪和酶标仪	Bio-Rad 公司

实验方法:

主要试剂配制:

DMEM/F12完全培养基: 取DMEM/F12培养基10 g溶于800 mL三蒸水中, 加入碳酸氢钠2.2 g, 调pH值至7.2~7.4, 加稀释双抗1 mL, 补加三蒸水至1 000 mL, 过滤除菌, 于4 °C保存。

0.1 mol/L甘油磷酸钠溶液: 取甘油磷酸钠1.08 g溶于50 mL MEM培养液中, 过滤除菌, 于4 °C保存。

50 mg/L抗坏血酸溶液: 取2.5 mg抗坏血酸溶于50 mL PBS中, 过滤除菌, 于-20 °C保存。

10^{-8} mol/L地塞米松溶液: 取0.04 g地塞米松溶于适量纯乙醇中, 三蒸水定容至100 mL, 过滤除菌, 于-20 °C保存。

大鼠BMSCs的培养: 取SD大鼠1只, 拉颈处死, 在体积分数为75%乙醇浸泡30 min, 于超净工作台内无菌条件下取双侧股骨和胫骨, 尽量去除附着在骨上的肌肉、筋膜, 咬骨钳剪去骨两端, DMEM/F12培养液冲出骨髓, 用10号注射器反复吹打, 经细胞筛过滤后用含体积分数为10%胎牛血清和1%青霉素/链霉素的DMEM/F12悬浮细胞, 将细胞悬液以 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 的浓度接种于培养皿中, 在37 °C、体积分数为5%CO₂、相对饱和湿度培养箱中培养。48 h后第1次换液, 以后每3 d换液1次。待原代细胞融

合率达90%时, 用0.25%胰酶/0.01%EDTA消化液室温下消化2.0~3.0 min, 显微镜下观察, 当细胞变圆时加DMEM/F12培养基终止消化, 去上清液, 用完全培养基重悬混匀, 以 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 的浓度接种于塑料培养皿中进行传代^[3]。

干预分组与成骨性诱导: 取生长状态良好的第3代BMSCs, 按 $1 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 的浓度接种于24只中皿中, 每组12只共分为2组, 对照组细胞仅用DMEM/F12培养基培养; 实验组以含成骨诱导剂的DMEM/F12培养基培养, 每3 d换液1次, 成骨诱导后7, 14, 21 d分别进行碱性磷酸酶、I 型胶原蛋白和钙化结节及骨钙素检测。

检测指标:

BMSCs的形态学观察: 用倒置相差显微镜观察原代培养的BMSCs及诱导后BMSCs生长、增殖情况并记录照相。

碱性磷酸酶定性染色: 成骨诱导后, 第7天采用偶氮偶合法进行碱性磷酸酶组织化学染色。标本用PBS漂洗2次, 体积分数为10%甲醛固定30 s, 加入染色液(20 mL pH 8.9的Michaelis氏巴比妥-HCl缓冲液中含 α -萘基磷酸钠和固蓝B盐各20 mg), 当出现蓝褐色斑点时即弃基质液, PBS漂洗, 并照相记录。

碱性磷酸酶的定量检测: 于诱导后第7天将培养液吸出, PBS洗2遍, 按碱性磷酸酶试剂盒操作步骤加入500 μL 基质液, 37 °C水浴15 min后加入750 μL 显色液, 用酶标仪测定504 nm处的吸光度(A)值。

Western blotting法检测 I 型胶原蛋白: 在诱导后7 d将细胞培养液吸出, 4 °C预冷的PBS漂洗2遍后, 加入500 μL 的细胞裂解液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0、150 mmol/L NaCl、100 mg/L PMSF、1 mg/L 抑蛋白酶肽、1%吐温-20、0.5%去氧胆酸钠、1%SDS)于冰上静置30 min使细胞充分裂解。4 °C, 12 000 r/min离心15 min, 取上清, 用BCA法进行总蛋白浓度的测定; 95 °C变性4 min, 各组取含50 μg 蛋白质样品, 经15%SDS-PAGE电泳分离后, 将蛋白质转移至PVDF膜上, 2%脱脂奶粉室温下摇床振荡封闭2 h, 然后加入 β -actin和I 型胶原的一抗(均为1:1 000稀释), 4 °C过夜; 次日加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:3 000)37 °C孵育2 h; 每进行下一步实验前PVDF膜均用4 °C预冷的PBST摇床漂洗3次, 10 min/次; 用增强化学发光法检测目的蛋白, X射线平片的曝光时间视实验效果而定, 灰度值使用Image-Proplus6.0软件扫描测定。

钙化结节染色: 成骨性诱导后第14天将培养液吸出, PBS漂洗2遍, 体积分数为10%甲醛固定5 min, 蒸馏水漂洗3次, 加入0.1%茜素红-Tris-HCl染色液(pH 8.3), 37 °C水浴60 min, 蒸馏水漂洗, 干燥后拍照。

ELISA法骨钙素测定: 成骨诱导培养后每3 d换液1次, 第21天时取1 mL旧培养液, 按照ELISA骨钙素试剂盒操作步骤进行检测, 绘制标准曲线, 定量分析细胞内骨钙素水平, 检测骨钙素的分泌量, 以 $\mu\text{g}/\text{皿}$ 表示。

主要观察指标: 成骨诱导剂诱导7, 14, 21 d检测各组碱性磷酸酶的活性、细胞矿化结节、I型胶原蛋白和骨钙素分泌量。

统计学分析: 由第一作者采用SPSS 16.0软件完成统计处理, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较选用LSD法, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 BMSCs形态学观察 见图1。

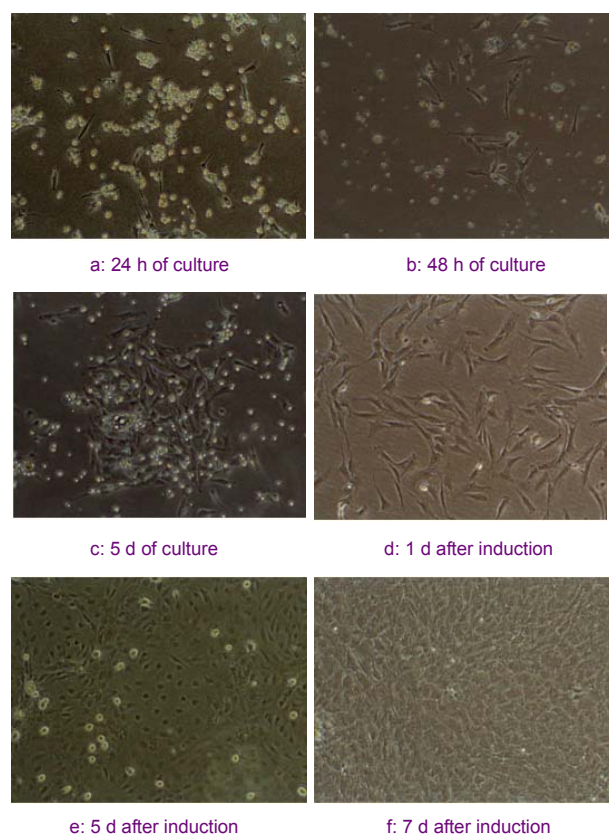


Figure 1 Morphology of bone marrow mesenchymal stem cells before and after induction under inverted phase contrast microscopy ($\times 100$)

图1 倒置相差显微镜观察诱导前后大鼠骨髓间充质干细胞形态变化($\times 100$)

倒置相差显微镜观察原代BMSCs在刚接种时, 细胞大多数悬浮, 含有较多的造血系细胞, 细胞呈圆形, 于12 h左右开始贴壁, 24 h后细胞贴壁, 见图1a, 48 h

首次换液后可观察到有三角形或梭形的BMSCs贴壁, 见图1b, 培养第5天时可见BMSCs形成细胞克隆, 细胞形态呈多角形、长梭形, 折光性好, 见图1c, 诱导后的BMSCs在第1天时细胞变化不明显, 仍以长梭形和三角形多见, 见图1d, 诱导后第5天细胞开始变为不规则形状、多角形, 卵圆形, 见图1e, 第7天细胞明显变圆, 融合紧密, 呈铺路石样外观, 见图1f。

2.2 碱性磷酸酶检测结果

碱性磷酸酶定性染色: 诱导后7 d, 实验组碱性磷酸酶的染色面积、染色深度, 均较对照组强, 见图2。

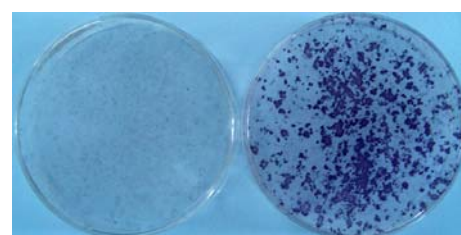
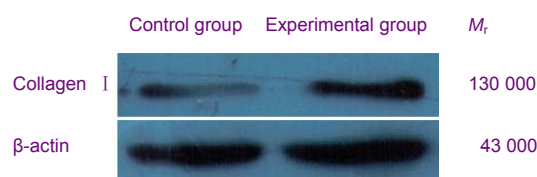


Figure 2 Alkaline phosphatase staining of bone marrow mesenchymal stem cells at 7 d after induction in the experimental and control groups

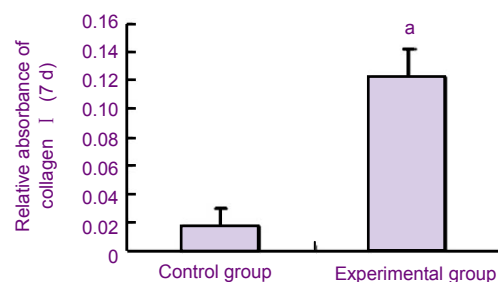
图2 BMSCs 诱导后第7天, 实验组和对照组碱性磷酸酶定性染色

碱性磷酸酶定量检测: 诱导后7 d对照组细胞A值为 126.60 ± 0.20 , 实验组为 217.49 ± 0.54 。经方差分析, 实验组碱性磷酸酶活性明显强于对照组($P < 0.01$)。

2.3 I型胶原蛋白检测 经成骨诱导培养后第7天, I型胶原蛋白的表达量较对照组明显升高, 差异有非常显著性意义($P < 0.01$), 见图3。



a: Western blot detection



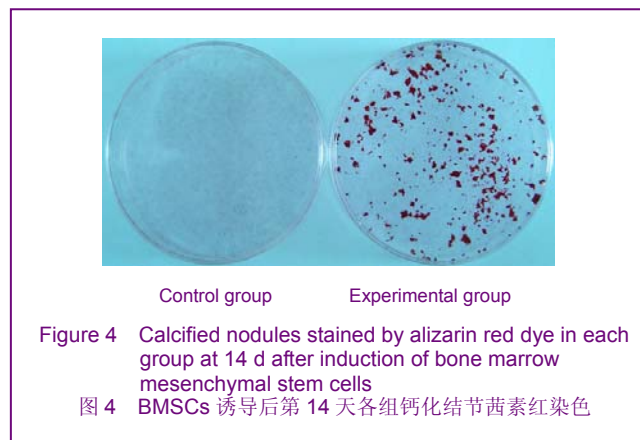
b: Relative A value of collagen I

^a $P < 0.01$, vs. control group

Figure 3 Collagen I expression in each group at 7 d after osteogenic induction

图3 成骨诱导培养后第7天各组I型胶原蛋白表达量

2.4 钙化结节染色 茜素红染色结果显示, BMSCs经成骨性诱导后矿化能力显著增强, 培养皿中布满了红色阳性克隆的钙化结节, 而对照组几乎没有钙化结节形成, 见图4。



2.5 骨钙素测定 经成骨性诱导培养后第21天, ELISA法检测骨钙素在波长450 nm的分泌量, 结果显示对照组和实验组分别为(76.250 0±0.000 8), (109.790 0±0.042 5) μg/皿。经方差分析, 实验组较对照组明显升高, 差异有非常显著性意义($P < 0.01$)。

3 讨论

间充质干细胞存在于体内多种组织中, 如骨髓、肺、甚至牙龈^[4-6], 但是主要存在于骨髓中, 然而骨髓中的BMSCs相对含量很少^[7-9], 因此将骨髓中的BMSCs在体外分离、纯化、培养, 从而建立良好的细胞系, 在组织工程的种子细胞获取上是很重要的。BMSCs有良好的增殖能力、可塑性以及多向分化潜能^[10], 在特定条件下可以分化为成骨细胞、软骨细胞、神经细胞、肝细胞等^[11-14]。所以, 探寻合适的诱导途径, 获得良好的种子细胞是组织工程研究的重点之一。

目前BMSCs分离、培养的方法主要有密度梯度离心法、流式细胞仪法、免疫磁珠法和全骨髓贴壁法^[15-18]。全骨髓贴壁法是利用BMSCs易于贴壁, 而造血系细胞悬浮生长这一特性进行分选, 实验采用全骨髓贴壁法来提取和纯化BMSCs, 结果表明此方法简单、实用, 那么可以应用此特性将提取的BMSCs进行成骨诱导, 进一步的提取和纯化诱导后的BMSCs, 因而此法为下一步BMSCs的成骨诱导实验打下基础。

BMSCs经成骨诱导剂(10^{-8} mol/L 地塞米松, 10 mmol/L β-甘油磷酸钠, 50 mg/L 抗坏血酸)诱导能分化为成骨细胞^[19]。地塞米松是一种糖皮质激素, 可提高碱性磷酸酶合成, 增加细胞骨钙素的表达, 诱导BMSCs向成骨细胞分化^[20]。实验中观察到BMSCs在高分化时, 它的增殖却减慢, 这可能与地塞米松对细胞的

增殖抑制有关。β-甘油磷酸与地塞米松在成骨分化方面具有协同作用, 增加碱性磷酸酶表达, 促进钙化。VitC是脯氨酸羟化的辅助分子, 通过诱导成骨细胞蛋白基因的表达, 刺激碱性磷酸酶合成, 提高胶原的合成, 同时增加钙盐形成。

碱性磷酸酶是成骨细胞分化早期重要指标之一^[21], 碱性磷酸酶活性越强, 表明成骨分化程度越高。实验发现骨髓间充质干细胞在诱导后第7天时就可以呈现阳性表达, 而对照组则为阴性, 说明诱导后的BMSCs具有成骨特性。茜素红染色显示在第14天时实验组就表达了成骨特性的另一标志物钙化结节。I型胶原由成骨细胞以原胶原的形式分泌, 在基质中被迅速裂解, 脱下N末端肽与C末端肽成为成熟的I型胶原, 它是骨有机质的主要成分, 占骨基质蛋白的80%~90%^[22]。实验检测到I型胶原蛋白表达阳性, 说明诱导后的细胞具有合成能力。骨钙素是骨基质主要的非胶原蛋白, 由成骨细胞合成和分泌, 在矿化后形成聚集。因此, 实验将骨钙素的检测放在诱导后21 d进行, 结果表明实验组的骨钙素水平明显高于对照组。

综上所述, 全骨髓贴壁法不仅是分离和纯化BMSCs可采用的一种简单、实用方法。应用 10^{-8} mol/L 地塞米松, 10 mmol/L β-甘油磷酸钠, 50 mg/L 抗坏血酸的联合成骨诱导剂可以将大鼠BMSCs在体外诱导分化为成骨样细胞, 并表达成骨表面标志物。说明BMSCs可作为良好的种子细胞应用于骨组织工程。但其诱导机制还不清楚, 在体内或体外分化过程中会受到许多生物因子、激素的影响, 有待进一步研究。

实验采用经典诱导剂, 将诱导后的BMSCs进行不同时间段的多种成骨指标应用不同方法检测, 检测结果阳性率高, 成骨活性好, 表明用全骨髓贴壁法提取和纯化的BMSCs可以体外诱导为成骨细胞, 表现良好的成骨活性, 那么将其与诱导后的BMSCs联合移植治疗骨缺损是否会取得更好的效果, 为此, 实验将为进一步BMSCs的移植打下基础。

4 参考文献

- [1] Jorgensen C, Gordeladze J, Noel D. Tissue engineering through autologous mesenchymal stem cells. *Curr Opin Biotechnol*. 2004; 15(5):406-410.
- [2] Bielby R, Jones E, McGonagle D. The role of mesenchymal stem cells in maintenance and repair of bone. *Injury*. 2007;38 Suppl 1:S26-S32.
- [3] Tseng PY, Chen CJ, Sheu CC, et al. Spontaneous differentiation of adult rat marrow stromal cells in a long-term culture. *J Vet Med Sci*. 2007;69(2):95-102.
- [4] Tropel P, Noël D, Platel N, et al. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. *Exp Cell Res*. 2004;295(2):395-406.
- [5] Hua J, Yu H, Dong W, et al. Characterization of mesenchymal stem cells (MSCs) from human fetal lung: potential differentiation of germ cells. *Tissue Cell*. 2009;41(6):448-455.
- [6] Tomar GB, Srivastava RK, Gupta N, et al. Human gingiva-derived mesenchymal stem cells are superior to bone marrow-derived mesenchymal stem cells for cell therapy in regenerative medicine. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;393(3):377-383.

- [7] Hung SC, Chen NJ, Hsieh SL, et al. Isolation and characterization of size-sieved stem cells from human bone marrow. *Stem Cells*. 2002;20(3):249-258.
- [8] Bruder SP, Fink DJ, Caplan AI. Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J Cell Biochem*. 1994;56(3):283-294.
- [9] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411): 143-147.
- [10] Wang XJ, Li QP. The roles of mesenchymal stem cells (MSCs) therapy in ischemic heart diseases. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;359(2):189-193.
- [11] Fisher M, Hyzy S, Guldberg RE, et al. Regeneration of bone marrow after tibial ablation in immunocompromised rats is age dependent. *Bone*. 2010;46(2):396-401.
- [12] Quintavalla J, Uziel-Fusi S, Yin J, et al. Fluorescently labeled mesenchymal stem cells (MSCs) maintain multilineage potential and can be detected following implantation into articular cartilage defects. *Biomaterials*. 2002;23(1):109-119.
- [13] Yamaguchi S, Kuroda S, Kobayashi H, et al. The effects of neuronal induction on gene expression profile in bone marrow stromal cells (BMSC)--a preliminary study using microarray analysis. *Brain Res*. 2006;1087(1):15-27.
- [14] Lee KD, Kuo TK, Whang-Peng J, et al. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology*. 2004;40(6):1275-1284.
- [15] Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol*. 1999;181(1):67-73.
- [16] Alok D, Hassin S, Sampath Kumar R, et al. Characterization of a pituitary GnRH-receptor from a perciform fish, *Morone saxatilis*: functional expression in a fish cell line. *Mol Cell Endocrinol*. 2000;168(1-2):65-75.
- [17] Encina NR, Billotte WG, Hofmann MC. Immunomagnetic isolation of osteoprogenitors from human bone marrow stroma. *Lab Invest*. 1999;79(4):449-457.
- [18] Chen JL, Guo ZK, Xu C, et al. Mesenchymal stem cells suppress allogeneic T cell responses by secretion of TGF-beta1. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. 2002;10(4):285-288.
- [19] Valenti MT, Dalle Carbonare L, Donatelli L, et al. Gene expression analysis in osteoblastic differentiation from peripheral blood mesenchymal stem cells. *Bone*. 2008;43(6):1084-1092.
- [20] McQuillan DJ, Richardson MD, Bateman JF. Matrix deposition by a calcifying human osteogenic sarcoma cell line (SAOS-2). *Bone*. 1995;16(4):415-426.
- [21] Kuznetsov SA, Krebsbach PH, Satomura K, et al. Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation in vivo. *J Bone Miner Res*. 1997;12(9):1335-1347.
- [22] Garnero P, Sornay-Rendu E, Chapuy MC, et al. Increased bone turnover in late postmenopausal women is a major determinant of osteoporosis. *J Bone Miner Res*. 1996;11(3):337-349.

来自本文课题的更多信息--

基金声明: 甘肃省自然科学基金项目(096RJZA077)。

作者贡献: 第一作者进行实验设计, 实验实施为第一、二、三作者, 实验评估为全部作者, 资料收集为第一作者, 第一作者成文, 通讯作者审核, 第一作者对文章负责。

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。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置符合中华人民共和国科学技术部 2006 年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》标准。

研究的创新之处与不足: 创新之处是在不同时间点采用灵敏检测度高的方法检测成骨指标。但实验设计对照相对单一, 没有其余实验组进行对照。



Mesh 词表主题词扩展: “基因, 即早-genes, immediate-early”

Immediate early genes (IEGs) are genes which are activated transiently and rapidly in response to a wide variety of cellular stimuli. They represent a standing response mechanism that is activated at the transcription level in the first round of response to stimuli, before any new proteins are synthesized. Thus IEGs are distinct from "late response" genes, which can only be activated later, following the synthesis of early response gene products. Thus IEGs have been called the "gateway to the genomic response". The term can describe viral regulatory proteins that are synthesized following viral infection of a host cell, or

cellular proteins that are made immediately following stimulation of a resting cell by extracellular signals. 在缺少新生蛋白合成的情况下进行快速和短暂

表达的基因。此术语最初仅用于病毒基因, 即早指在病毒整合进入宿主细胞后即刻进行的转录。也用于对静息细胞被胞外信号, 如生长因子和神经递质刺激后即刻表达的细胞基因。

英文主题词	Genes, Immediate-Early
英文注释	Genes that show rapid and transient expression in the absence of de novo protein synthesis. The term was originally used exclusively for viral genes where immediate-early referred to transcription immediately following virus integration into the host cell. It is also used to describe cellular genes which are expressed immediately after resting cells are stimulated by extracellular signals such as growth factors and neurotransmitters.
中文主题词	基因, 即早
中文注释	在缺少新生蛋白合成的情况下进行快速和短暂表达的基因。此术语最初仅用于病毒基因, 即早指在病毒整合进入宿主细胞后即刻进行的转录。也用于对静息细胞被胞外信号, 如生长因子和神经递质刺激后即刻表达的细胞基因。