

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.33.003 [http://www.crter.org]
廖家成, 贝抗胜, 连银川. 骨形态发生蛋白7诱导骨膜细胞碱性磷酸酶的表达[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(33): 5917-5922.

骨形态发生蛋白7诱导骨膜细胞碱性磷酸酶的表达**

廖家成¹, 贝抗胜², 连银川¹ (¹深圳市龙华人民医院骨外科, 广东省深圳市 518109; ²韶关市粤北人民医院, 广东省韶关市 512025)

文章亮点:

1 实验用 β 2-甘油酸钠+地塞米松+维生素 C 作为骨膜细胞培养辅助剂, 比较了含骨形态发生蛋白 7 及成骨培养辅助剂与单纯应用培养辅助剂诱导后骨膜细胞碱性磷酸酶的表达。

2 骨膜细胞其成骨能力与细胞浓度有关, 一般认为 $(0.7-20) \times 10^9 L^{-1}$ 是较好的初始接种浓度, 故实验采取的种子细胞浓度为 $1 \times 10^8 L^{-1}$ 。

3 实验结果表明, 由骨形态发生蛋白 7 诱导的骨膜细胞成骨标志物碱性磷酸酶阳性率明显高于单纯应用培养辅助剂诱导。说明骨形态发生蛋白 7 能诱导骨膜细胞加强碱性磷酸酶的表达, 能诱导骨膜细胞向成骨细胞转化。

关键词:

组织构建; 骨组织构建; 骨形态发生蛋白 7; 骨膜细胞; 碱性磷酸酶; 诱导; 成骨细胞; 细胞培养; 省级基金

摘要

背景: 关于骨形态发生蛋白 7 作为刺激因子诱导细胞成骨的报道目前较少见。

目的: 观察骨膜细胞经骨形态发生蛋白 7 诱导后碱性磷酸酶的表达。

方法: 取材于成人胫骨骨膜, 常规细胞培养法行骨膜细胞体外培养, 分为实验组和对照组, 分别加入骨形态发生蛋白 7 加成骨细胞培养辅助剂和单纯成骨细胞培养辅助剂, 相差显微镜观察骨膜细胞形态特征及超微结构。每组分别在第 7, 14, 21 天设 3 个时间点, 每个时间点设 3 个样本, 采用碱性磷酸酶试剂盒法检测成骨细胞特异性标志物碱性磷酸酶表达情况。

结果与结论: 骨膜细胞经分组培养后, 第 7 天时, 实验组和对照组骨膜细胞均有明显增殖, 碱性磷酸酶的可被检测出, 但量不多, 细胞外形为梭形, 实验组比对照组检测的碱性磷酸酶数量稍多; 第 14 天时, 实验组及对照组骨膜细胞均显著增殖, 细胞外形由梭形变为宽梭形, 实验组比对照组检测的碱性磷酸酶数量明显增多。第 21 天时, 实验组及对照组骨膜细胞均增殖, 其中实验组细胞增殖明显, 细胞外形为宽梭形, 实验组比对照组检测的碱性磷酸酶数量显著增多。经过统计学分析由骨形态发生蛋白 7 诱导的骨膜细胞的成骨标志物碱性磷酸酶阳性率明显高于对照组 ($P < 0.01$)。提示骨膜细胞具有良好的成骨和再生能力, 骨形态发生蛋白 7 能诱导骨膜细胞加强碱性磷酸酶的表达, 能诱导骨膜细胞向成骨细胞转化。

Bone morphogenetic protein-7 induces the expression of alkaline phosphatase in periosteal cells

Liao Jia-cheng¹, Bei Kang-sheng², Lian Yin-chuan¹ (¹Department of Orthopedic Surgery, Longhua People's Hospital, Shenzhen 518109, Guangdong Province, China; ² Yue Bei People's Hospital, Shaoguan 512025, Guangdong Province, China)

Abstract

BACKGROUND: The reports on bone morphogenetic protein-7 as a stimulating factor to induce osteogenic are relatively rare.

OBJECTIVE: To study the expression of alkaline phosphatase of periosteal cells after induced by bone morphogenetic protein-7 *in vitro*.

METHODS: Periosteal cells were obtained from adult tibial periosteum, and then the periosteal cells were cultured by routine method *in vitro*. The cells were divided into experimental group and control group, and then cultured with bone morphogenetic protein-7 plus osteoblast culture adjuvants and simple osteoblast culture adjuvants, respectively. The phase contrast microscope was used to observe the morphology and ultrastructure of periosteal cells. Each group was observed at 7, 14 and 21 days, and three samples were observed at each time point. Alkaline phosphatase kit was used to detect the expression of osteoblast-specific markers alkaline phosphatase.

RESULTS AND CONCLUSION: After cultured for 7 days, the proliferation of periosteal cells in the experimental group and the control group was increased obviously, and the expression of alkaline phosphatase was detected but less. The cells were spindle in shape, while the expression of alkaline phosphatase in the experimental group was higher than that in the control group. After cultured for 14 days, the proliferation of periosteal cells in the experimental group and the control group was increased obviously, the cell morphology was changed from

廖家成★, 男, 1981年生, 江西省赣州市人, 汉族, 2010年汕头大学医学院毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事手外科的研究。Ljc076@163.com

中图分类号:R318
文献标识码:A
文章编号:2095-4344
(2013)33-05917-06

收稿日期: 2012-12-23
修回日期: 2013-02-22
(20121223003/W · C)

Liao Jia-cheng★, Master, Attending physician, Department of Orthopedic Surgery, Longhua People's Hospital, Shenzhen 518109, Guangdong Province, China Ljc076@163.com

Supported by: Guangdong Scientific and Technological Projects, No. 2005B36001054*; the Social Public Welfare Project of the Scientific and Technological Plan of Baoan District, Shenzhen City*

Received: 2012-12-23
Accepted: 2013-02-22

spindle-shaped to wide spindle-shaped, and the expression of alkaline phosphatase in the experimental group was increased significantly when compared with the control group. After cultured for 21 days, the proliferation of periosteal cells was detected in the experimental group and the control group, and the proliferation in the experimental group was more significant than that in the control group, the cell morphology was wide spindle-shaped, and the number of alkaline phosphatase in the experimental group was higher than that in the control group. Statistical analysis showed that the positive rate of osteogenic markers alkaline phosphatase of bone morphogenetic protein-7 induced periosteal cells in the experimental group was higher than that in the control group ($P < 0.01$). It suggested that periosteal cells had the osteogenic and regeneration ability, the bone morphogenetic protein-7 could induce periosteal cells, promote the expression of alkaline phosphatase, and could induce the periosteal cells to transform into osteoblasts.

Key Words: tissue construction; bone tissue construction; bone morphogenetic protein-7; periosteal cells; alkaline phosphatase; induction; osteoblasts; cell culture; provincial grants-supported paper

Liao JC, Bei KS, Lian YC. Bone morphogenetic protein-7 induces the expression of alkaline phosphatase in periosteal cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(33): 5917-5922.

0 引言

骨组织工程中,要解决的两个关键问题是种子细胞和诱导因子。目前骨膜来源的骨膜细胞、骨组织来源的骨膜细胞、骨髓来源的基质干细胞和骨外组织来源的干细胞均可作为骨组织工程种子细胞,这些细胞从取材、培养、与材料复合、体内植入到最终形成骨组织均已被实验证实具有确切的成骨能力。

体外培养条件下,骨膜来源的骨膜细胞具有很强的传代增殖和稳定的定向分化能力,较骨髓基质干细胞具有更强的成骨能力,体内植入后能很好地适应受区环境,并保持良好的成骨活性,最终通过软骨化骨修复骨缺损^[1-3]。

骨膜细胞具有很强的成骨能力,贝抗胜、刘建平^[4]经实验证实骨膜细胞植入机体后能适应受区环境,保持成骨活性,并促成基质矿化形成骨组织,具有良好的成骨和再生能力,在骨骼的成长发育和修复过程中发挥重要作用。

骨形态发生蛋白除骨形态发生蛋白1外构成一个结构和功能相似的多肽因子家族,同属于转化生长因子 β 超家族的成员^[5]。骨形态发生蛋白是目前最肯定的具有诱导成骨作用的生长因子,骨组织工程中常用的骨形态发生蛋白是骨形态发生蛋白2,有学者证实骨形态发生蛋白2因子对成骨细胞、骨髓基质细胞,骨间质干细胞,骨祖细胞均有促进成骨作用^[6-7]。

骨形态发生蛋白7对骨膜细胞的诱导作用的报道比较少。祝联、陈付国等^[8]对骨形态发生蛋白7对骨髓基质细胞成骨作用做了相关研究,认为骨形态发生蛋白7对骨髓基质细胞有促进其分化成骨作用。

骨形态发生蛋白诱导成骨目前认为有3个必要条件^[9],①诱导因子的存在:骨形态发生蛋白作为一种诱导因子当局部浓度达到一定程度,就可以诱导骨生成。骨形态发生蛋白有效量是指可引起诱导成骨作用的最小骨形态发生蛋白量^[10]。骨折端的坏死、吸收可以释放内源性骨形态发生蛋白,骨形态发生蛋白向周围扩散,

形成一个由近及远逐渐降低的浓度梯度。成骨量与骨形态发生蛋白浓度成正比,与扩散距离成反比。②骨形态发生蛋白的靶细胞群:骨髓中存在定向性成骨细胞及诱导性成骨细胞^[11],前者可以自行分化为成骨细胞,而后者需要分子信号诱导分化。作为骨形态发生蛋白靶细胞的是诱导性成骨细胞。体外实验认为骨形态发生蛋白靶细胞还有:结缔组织中未分化、有活力的间充质细胞、骨膜基质细胞、骨膜细胞^[12]。③允许骨生长的正常环境。

实验选用骨形态发生蛋白7诱导骨膜细胞体外培养,对其诱导后骨膜细胞碱性磷酸酶的量检测,为进一步实验选取了良好的细胞源和诱导因子。

1 材料和方法

设计: 细胞学免疫组织化学实验。

时间和地点: 于2010年5至12月在复旦大学遗传所实验室完成。

材料:

骨形态发生蛋白7诱导骨膜细胞碱性磷酸酶的检测实验所用试剂及设备:

试剂及仪器	来源
DMEM/F12 培养基、2.5 g/L 胰蛋白酶、胎牛血清、100 U/mL 青链霉素	Gibco 公司
0.1 μ mol/L 地塞米松、10 mmol/L β 甘油磷酸钠	SOLAR BIO 公司
50 mg/L 维生素 C	天津制药
骨形态发生蛋白 7、碱性磷酸酶染色试剂盒	南京建成科技有限公司
二甲基亚砷	上海生工生物工程公司
CO ₂ 培养箱	美国 Thermo Fisher Scientific 公司
倒置相差显微镜(型号 AE-31)	厦门 MOTIC 公司
扫描电镜(H27650 型)	日立
电子天平(型号 BT224S)	北京赛多利斯公司
水平离心机	上海安亭仪器厂
普通冰箱(型号 KK24V4T1)	德国西门子
水浴锅(型号 HSGJC-2)	上海华药科学仪器有限公司
电热恒温鼓风干燥箱(型号 DHG-9240)	上海一恒科技有限公司

成骨细胞培养辅助剂: 传代细胞培养液+地塞米松 10 mol/L+ β 2-甘油磷酸钠80 mg/L+维生素C 80 mg/L, pH 7.3。

实验方法:

骨膜细胞取材: 术中取自胫骨骨折患者胫骨上段前外侧正常骨膜(骨膜提供者对此知情同意), 术中仔细剔除其表面的肌肉等软组织, 用尖刀切穿1 cm \times 1 cm范围的骨膜全层后, 使用骨膜剥离器紧贴骨皮质表面剥下骨膜。

骨膜细胞体外培养: 骨膜用PBS冲洗干净, 剪成1 mm \times 1 mm碎块, 置于DMEM/F12培养液(含体积分数15%小牛血清、青霉素100 U/mL、链霉素100 U/mL), 体积分数5%CO₂ 37 °C恒温培养原代细胞。人骨膜细胞原代培养方法同文献[4]。将原代骨膜细胞制成细胞悬液, 接种于培养瓶内, 加入含体积分数10%小牛血清的DMEM/F12培养基, 在37 °C, 体积分数5%CO₂恒温培养箱中培养。每隔三四天更换1次培养液。相差显微镜下观察见骨膜细胞融合至约90%时, 用2.5 g/L胰蛋白酶消化3–5 min后离心, 弃上清, 重悬, 按1:3比例传代培养, 传至3代后进行实验。

实验分组及诱导培养: 实验分为2组: 含骨形态发生蛋白7及成骨培养辅助剂的实验组和单纯应用培养辅助剂的对照组。将传至3代的骨膜细胞制成浓度为 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 细胞悬液, 按 2×10^4 /孔的细胞数目接种在预置有圆形盖玻片的24孔板中进行培养。待培养24 h细胞贴壁后, 实验组加入骨形态发生蛋白7(40 $\mu\text{g/L}$)及辅助剂(DMEM/F12 + 体积分数10%胎牛血清+100 U/mL青链霉素+0.1 $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松+50 mg/L维生素C+10 mmol/L β 甘油磷酸钠), 对照组单纯加入辅助剂。置体积分数5%CO₂, 37 °C培养箱培养。每两三天换液1次。

骨膜细胞形态学观察: 普通培养的骨膜细胞与实验组和对照组均每日于倒置显微镜下观察骨膜细胞生长情况及其形态。

成骨指标检测: 碱性磷酸酶是成骨细胞分化成熟早期的标志酶之一, 其活性高低一定程度上可以反映出细胞的成骨分化能力。分别在7, 14, 21 d时取出细胞爬片, 按碱性磷酸酶试剂盒法进行成骨细胞标志物碱性磷酸酶染色检测。具体步骤: ①取出新鲜细胞爬片滴加固定液, 室温固定3 min, 水洗。②滴加作用液数滴, 玻片置湿盒内, 加盖疏水膜, 避光于37 °C孵育15 min, 水洗。③趁湿滴加苏木精复染液数滴, 复染3 min, 水洗, 镜检。显微镜下观察阳性细胞核呈紫色, 胞浆中出现蓝紫色颗粒。阳性细胞计数方法: 实验组和对照组每张盖玻片均随机取3个视野, 采用网格计数法, 计算阳性率。

主要观察指标: ①体外骨膜细胞普通培养的形态学

观察。②骨形态发生蛋白7诱导后的骨膜细胞形态学观察。③骨膜细胞碱性磷酸酶染色阳性率。

统计学分析: 所有数据均用SPSS 17.0软件分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 对组间变量采用配对t 检验进行统计学分析。

2 结果

2.1 骨膜细胞形态学变化

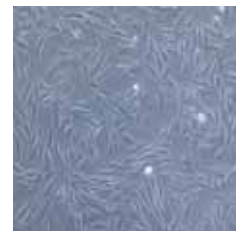
体外骨膜细胞普通培养的形态学观察: 接种于T25细胞培养瓶后, 给予含体积分数10%小牛血清的完全培养基培养。骨膜细胞24 h后完全贴壁, 早期呈梭形, 饱满透明, 立体感强; 个别可见细胞两极有细丝状突起, 随后开始增殖, 72 h后细胞增殖分裂迅速, 分裂期呈立方或短柱状, 体积逐渐增大, 向成纤维细胞状改变逐渐变成宽梭和不规则形, 后期细胞排列紧密, 成漩涡状生长, 细胞之间无接触抑制现象, 呈典型的长梭形、平行或漩涡状排列, 集落间出现重叠。见图1–3。



注: 骨膜细胞应用含体积分数 10%小牛血清的完全培养基培养 24 h 后完全贴壁, 早期呈梭形, 饱满透明, 立体感强。

图 1 体外培养 1 d 人骨膜细胞形态学观察($\times 200$)

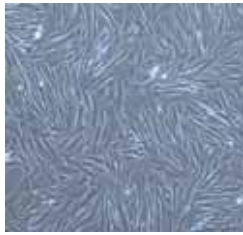
Figure 1 Morphology of human periosteal cells after cultured for 1 d ($\times 200$)



注: 应用含体积分数 10%小牛血清的完全培养基培养个别细胞可见两极有细丝状突起, 随后开始增殖。

图 2 体外培养 3 d 人骨膜细胞形态学观察($\times 200$)

Figure 2 Morphology of human periosteal cells after cultured for 3 d ($\times 200$)



注: 应用含体积分数 10% 小牛血清的完全培养基培养 72 h 后细胞增殖分裂迅速, 细胞排列紧密, 呈典型的长梭形、平行或旋涡状排列, 集落间出现重叠。

图 3 体外培养 7 d 人骨膜细胞形态学观察(×200)

Figure 3 Morphology of human periosteal cells after *in vitro* cultured for 7 d (×200)

骨形态发生蛋白7诱导后的骨膜细胞形态学观察: 对照组骨形态发生蛋白7诱导骨膜细胞形态学观察见图4-6, 单纯加入辅助剂后, 细胞生长速度减缓, 细胞初始为长梭形, 随时间延长形态改变不明显, 形成的细胞集落比较少。



注: 细胞生长速度减缓, 细胞初始为长梭形。

图 4 对照组单纯加入辅助剂培养 7 d 骨膜细胞形态学观察(×200)

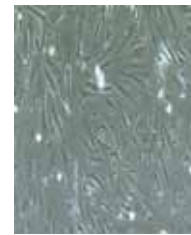
Figure 4 Morphology of human periosteal cells in the control group after cultured with osteoblast culture adjuvants for 7 d (×200)



注: 细胞随时间延长形态改变不明显。

图 5 对照组单纯加入辅助剂培养 14 d 骨膜细胞形态学观察(×200)

Figure 5 Morphology of human periosteal cells in the control group after cultured with osteoblast culture adjuvants for 14 d (×200)



注: 细胞形成的细胞集落比较少。

图 6 对照组单纯加入辅助剂培养 21 d 骨膜细胞形态学观察(×200)

Figure 6 Morphology of human periosteal cells in the control group after cultured with osteoblast culture adjuvants for 21 d (×200)

实验组骨形态发生蛋白7诱导骨膜细胞形态学观察见图7-9。



注: 细胞生长速度明显减缓, 细胞初始仍为长梭形。

图 7 加入骨形态发生蛋白 7 及辅助剂诱导 7 d 实验组骨膜细胞形态学观察(×200)

Figure 7 Morphology of human periosteal cells in the experimental group after cultured with bone morphogenetic protein-7 plus osteoblast culture adjuvants for 7 d (×200)



注: 细胞随时间延长逐渐变成多边形和三角形。

图 8 加入骨形态发生蛋白 7 及辅助剂诱导 14 d 实验组骨膜细胞形态学观察(×200)

Figure 8 Morphology of human periosteal cells in the experimental group after cultured with bone morphogenetic protein-7 plus osteoblast culture adjuvants for 14 d (×200)



注: 与成骨细胞形态相似, 并能增殖形成细胞集落。

图9 加入骨形态发生蛋白7 及辅助剂诱导 21 d 实验组骨膜细胞形态学观察(×200)

Figure 9 Morphology of human periosteal cells in the experimental group after cultured with bone morphogenetic protein-7 plus osteoblast culture adjuvants for 21 d (×200)

加入骨形态发生蛋白7及辅助剂后, 细胞生长速度明显减缓, 细胞初始仍为长梭形, 随时间延长逐渐变成多边形和三角形, 与成骨细胞形态相似, 并能增殖形成细胞集落。

2.2 骨膜细胞碱性磷酸酶染色阳性率 碱性磷酸酶是成骨细胞的标志性酶, 成骨细胞含丰富的碱性磷酸酶。显微镜下观察阳性细胞核呈紫色, 胞浆中出现蓝紫色颗粒。阳性细胞计数方法: 实验组和对照组每张盖玻片均随机取 3 个视野, 采用网格计数法, 计算阳性细胞百分率。

经骨向诱导剂及骨形态发生蛋白7诱导7, 14, 21 d 实验组细胞碱性磷酸酶染色阳性率均较单纯骨向诱导剂的对照组显著增高, 差异有非常显著性意义($P < 0.01$)。见表1。

表 1 骨膜细胞碱性磷酸酶染色阳性率

Table 1 Positive rate of human periosteal cells for alkaline phosphatase ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	第 7 天	第 14 天	第 21 天
对照组	20.23±2.62	30.12±3.03	28.66±1.21
实验组	50.34±14.60 ^a	85.47±3.12 ^a	90.14±2.64 ^a

与对照组比较, ^a $P < 0.01$ 。

注: 对照组单纯加入辅助剂培养, 实验组加入骨形态发生蛋白7 及辅助剂培养; 实验组经骨向诱导剂及骨形态发生蛋白7 诱导 7, 14, 21 d 后, 细胞碱性磷酸酶染色阳性率均较单纯骨向诱导剂的对照组显著增高。

抑制细胞的增殖、分化、迁移和基因的表达。骨组织工程涉及的细胞因子众多, 其中骨形态发生蛋白是目前已知的最有效的促骨生长因子。它是广泛存在于动物骨骼、牙齿中的一族低分子糖蛋白多肽, 在骨形成中起着重要的作用。有学者采用原位杂交技术观测到骨形态发生蛋白7 在犬恒牙牙根发育早期和成牙骨质细胞本质细胞中有表达^[13]。因此, 骨形态发生蛋白7 可作为骨生长的重要表达因子在骨组织工程中采用。

实验用 β 2-甘油酸钠+地塞米松+维生素 C 作为骨膜细胞培养辅助剂, 辅助剂提供了必要的物质, 取到了类似细胞培养基的作用。其中地塞米松可以辅助成骨细胞分化成熟, 提高碱性磷酸酶活性, 调节成骨细胞分泌胰岛素样生长因子, 促进细胞外基质胶原合成。维生素 C 可以促进培养的细胞合成 I 型胶原, 形成钙化, 并调节 ATP、碱性磷酸酶活性和非胶原基质蛋白的合成^[14], β 2-甘油磷酸钠则为成骨细胞功能活动提供磷酸根离子, 其作为碱性磷酸酶的底物, 在培养液中迅速被有机磷酸酶水解, 产生大量磷酸离子, 促进生理性钙盐的沉积和钙化, 是骨膜细胞诱导发生矿化结节沉积的必要条件。

实验选用的骨膜细胞具有很强的成骨能力^[4], 其本身是成骨细胞的前体细胞, 大量的骨膜细胞位于骨膜生发层, 在不同的诱导因子的作用下, 可向成骨化及软骨化两个方向分化, 类似于骨髓基质细胞或骨祖细胞。许多实验研究表明, 骨膜细胞其成骨能力与细胞浓度有关。当高于 $5.0 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 时, 骨形成是连续的, 而低于 $5.0 \times 10^6 \text{ L}^{-1}$ 时, 就观察不到骨的形成。一般认为 $(0.7-20) \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 是较好的初始接浓度, 故实验采取的种子细胞浓度为 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 。

3.2 研究碱性磷酸酶对骨膜细胞成骨的重要意义 碱性磷酸酶是广泛分布于人体各脏器官中, 其中以肝脏为最多其次为肾脏, 骨骼、肠、和胎盘等组织。它是几种显性基因的产物。其基因定位于 1 号染色体, 基因的启动子可以被激活而产生持续的低活性, 然后在特殊组织中产生高活性^[15]。

目前认为骨碱性磷酸酶是成骨细胞的表型标志物之一, 它可直接反映成骨细胞的活性或功能状况, 是近年来主要用于小儿佝偻病早期诊断和亚临床鉴别的特异性参考指标, 也是目前用于评价人体骨矿化障碍的最佳指标。碱性磷酸酶的活性的高低直接关系到成骨细胞分泌胶原的量, Thomas 等^[16]研究表明, 碱性磷酸酶活性的升高为细胞间质含量的改变作好准备, 并且是启动矿化的必备条件, 碱性磷酸酶可分解有机质中的磷酸, 增加局部无机磷酸浓度, 促进矿化。

目前, 一般认为成骨细胞具有以下主要生物学特征: 成骨细胞在成骨过程中发挥着主要作用, 它以类似顶浆分泌的方式形成基质小泡, 其中含有丰富的碱性磷

3 讨论

3.1 细胞因子和种子细胞的选择 细胞因子能促进或

酸酶。基质小泡分布于成骨细胞与骨细胞附近的类骨质中,当其破裂后,碱性磷酸酶释出,分解局部磷酸钙盐,使局部的磷脂和游离钙离子浓度增高。磷质与钙有强的亲和力,沉积于类骨质,从而导致其迅速钙化成骨。因此成骨细胞具有较其他细胞更高的碱性磷酸酶含量,碱性磷酸酶染色强阳性。可以作为成骨细胞的标志之一,因此研究骨形态发生蛋白7作用下成骨细胞碱性磷酸酶活性改变具有重要意义。

致谢:对于本文提供帮助的复旦大学遗传所实验室的各位老师表示感谢,感谢贝抗胜导师、孙庆文教授,季国庆老师在实验设计、细胞培养,细胞实验及成文修改等方面给予宝贵意见和帮助。

基金资助:广东省科技攻关项目(2005B36001054);深圳市宝安区科技计划社会公益项目。

作者贡献:设计、实施、评估为本文作者,均受过专业培训,采用盲法评估。

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:参与实验的个体供者对实验过程完全知情同意。

学术术语:骨形态发生蛋白7并非一个新蛋白,与骨形态发生蛋白家族中的其他成员一样,它在间充质细胞向骨和软骨的转化中起了关键作用,它也参与了骨平衡。此外,美国FDA批准人重组骨形态发生蛋白7用于手术过程中,以协助骨修复。

作者声明:文章为原创作品,数据准确,内容不涉及泄密,无一稿两投,无抄袭,无内容剽窃,无作者署名争议,无与他人课题以及专利技术的争执,内容真实,文责自负。

4 参考文献

- [1] 宋守礼,朱盛修,孙翠萍,等.骨膜细胞移植修复股骨头缺血性坏死的实验研究[J].中华医学杂志,1998,78(1):52-54.
- [2] 宋守礼,朱盛修,张伯勋,等.经皮注射自体骨膜细胞修复骨缺损的实验研究[J].中华骨科杂志,1997,17(11):696-698.
- [3] Akihiko T, Yukie K, Kiyonori H, et al. Osteogenic potential of cultured periosteal cells in distracted bone gap in rabbits. J Sur Res. 1998;78(1):68-77.
- [4] 贝抗胜,刘建平.人骨膜细胞体外培养的实验研究与临床应用[J].中国矫形外科杂志,2004,9(17):1329-1331.
- [5] Wozney JM. The bone morphogenetic protein family: multifunctional cellular regulators in the embryo and adult. Eur J Oral Sci. 1998;106(Suppl1):160-166.
- [6] 胡丽玲,李晓霞,张镜宇,等.BMP2与BMP7嵌合表达产物可诱导成骨细胞分化[J].天津医药,2009,37(10):820-822.
- [7] 温学红,郭若霖,程瑞芳,等.BMP-2和地塞米松对成人成骨细胞增殖和分化的影响[J].临床检验杂志,2005,23(1):34-37.
- [8] 祝联,陈付国,刘伟,等.骨髓基质干细胞转染腺病毒BMP7后的成骨改变[J].中华整形外科杂志,2006,22(3):59-62.
- [9] Reddi AH. Morphogenesis and tissue engineering of bone and cartilage: inductive signals, stem cells and biomimetic biomaterials. Tissue Eng. 2000;6:351-359.
- [10] 张子军,卢世璧,王继芳,等.骨缺损中内源性BMP的分布及其作用[J].中华外科杂志,1996,34:596-597.
- [11] Reddi AH. Bone morphogenetic proteins, bone marrow stromal cells, and mesenchymal stem cells. Clin Orthop. 1995;313:115-119.
- [12] Bosch P, Musgrave DS, Lee J Y, et al. Osteoprogenitor cells with in skeletal muscle. J Orthop Res. 2000;18:933-944.
- [13] 轩昆,杨富生,文玲英,等.BMP3、BMP4、BMP7在犬牙根发育过程中的表达研究[J].实用口腔医学杂志,2006,22(6):807-810.
- [14] 彭丽萍,姚程,姜振宇.正常人骨髓基质支持造血的试验研究[J].中华血液学杂志,2001,22(12):659-660.
- [15] 刘忠厚.骨质疏松学[M].北京:科学出版社,1998:87-88.
- [16] Thomas AO, Michael A, Victoria S, et al. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationship in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. J Cell Physiol. 1990;143-420.