

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.06.020 [http://www.crter.org]
肖仕辉, 韦庆军, 赵劲民, 薄占东, 韦积华, 李伟岸. 全骨髓贴壁法培养兔骨髓间充质干细胞体外定向成骨诱导分化及鉴定[J].
中国组织工程研究, 2013, 17(6):1069-1074.

全骨髓贴壁法培养兔骨髓间充质干细胞体外定向成骨诱导分化及鉴定*★

肖仕辉, 韦庆军, 赵劲民, 薄占东, 韦积华, 李伟岸

广西医科大学第一附属医院创伤手外科, 广西壮族自治区南宁市 530021

文章亮点:

全骨髓贴壁法培养兔骨髓间充质干细胞, 操作简单容易, 通过换传代可以获得纯度较高且具有贴壁活性的兔骨髓间充质干细胞, 在体外经成骨诱导剂的作用下, 骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化后生长良好, 表现出与成骨细胞相似的形态学和生物学特性。

关键词:

干细胞; 干细胞培养与分化; 全骨髓贴壁法分离法; 骨髓间充质干细胞; 细胞培养; 成骨分化; 组织工程骨; 省级基金; 干细胞图片文章

摘要

背景: 流式细胞仪分离法和免疫磁珠分离法对细胞活性影响较大, 密度梯度离心法虽然能够获得纯度高的单核细胞, 但由于多次离心可造成细胞的大量流失且对细胞活性有一定的影响使其应用值得商榷。

目的: 采用全骨髓贴壁法分离兔骨髓间充质干细胞进行成骨诱导分化及鉴定。

方法: 采用全骨髓贴壁法体外分离培养兔骨髓间充质干细胞, 倒置显微镜下观察细胞形态学特征。在成骨诱导剂作用下, 通过碱性磷酸酶染色试剂盒行碱性磷酸酶染色, I型胶原免疫细胞化学染色, Von Kossa法及茜素红进行矿化结节染色以及电镜下检测兔骨髓间充质干细胞成骨诱导后的形态结构。

结果与结论: 经诱导后细胞出现与成骨细胞相似的形态学特征, 碱性磷酸酶染色阳性, I型胶原免疫细胞化学染色, Von-Kossa法及茜素红矿化结节染色阳性。表明经成骨诱导剂诱导后全骨髓贴壁法体外分离纯化培养的兔骨髓间充质干细胞能向成骨细胞方向分化增殖。

肖仕辉★, 男, 1984年生, 江西省广丰县人, 汉族, 广西医科大学在读硕士, 主要从事创伤骨科的修复与重建及组织工程研究。
xiaoshihui007@126.com

通讯作者: 韦庆军, 副教授, 副主任医师, 广西医科大学第一附属医院创伤手外科, 广西壮族自治区南宁市 530021
weiqingjunxnn@163.com

中图分类号: R394.2
文献标识码: B
文章编号: 2095-4344
(2013)06-01069-06

收稿日期: 2012-05-19
修回日期: 2012-06-16
(20120319023/W·C)

In vitro osteogenic differentiation and identification of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells isolated and cultured with whole bone marrow adherent culture method

Xiao Shi-hui, Wei Qing-jun, Zhao Jin-min, Bo Zhan-dong, Wei Ji-hua, Li Wei-an

Department of Trauma and Hand Surgery, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Abstract

BACKGROUND: The flow cytometry and immunomagnetic separation method have greater impact on cell viability, and although the density gradient centrifugation method can be used to obtain the high purity monocytes, however, the multiple centrifugation may cause a huge loss of cells and has some impact on the cell activity, so the application is debatable.

OBJECTIVE: To isolate and culture rabbit bone marrow mesenchymal stem cells with whole bone marrow adherent culture method for osteogenic differentiation and identification.

METHODS: The rabbit bone marrow mesenchymal stem cells were isolated and cultured by whole bone marrow adherent culture method, then the morphological characteristics of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells were observed under inverted microscope. Under the induction of osteogenic

Xiao Shi-hui★, Studying for master's degree, Department of Trauma and Hand Surgery, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China
xiaoshihui007@126.com

Corresponding author: Wei Qing-jun, Associate professor, Associate chief physician, Department of Trauma and Hand Surgery, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China
weiqingjungxnn@163.com

Received: 2012-05-19
Accepted: 2012-06-16

inducer, alkaline phosphatase staining, type I collage immunocytochemical staining, alizarin red staining and Von-Kossa staining were performed to observe the morphology of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells after osteogenic induction by electron microscope.

RESULTS AND CONCLUSION: After *in vitro* induced differentiation, rabbit bone marrow mesenchymal stem cells exhibited the morphological and biological characteristics similar to typical osteoblasts, alkaline phosphatase staining, type I collagen immunocytochemical staining, and Von-Kossa staining and alizarin red mineralization nodules staining were positive. All results indicate that rabbit bone marrow mesenchymal stem cells *in vitro* isolated and cultured with whole bone marrow adherent culture method can be induced to differentiate into osteoblasts after osteogenic induction.

Key Words: stem cells; stem cell culture and differentiation; whole bone marrow adherent culture method; bone marrow mesenchymal stem cells; cell culture; osteogenic differentiation; tissue-engineering bone; provincial grants-supported paper; stem cell photographs-containing paper

Xiao SH, Wei QJ, Zhao JM, Bo ZD, Wei JH, Li WA. In vitro osteogenic differentiation and identification of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells isolated and cultured with whole bone marrow adherent culture method. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2013;17(6):1069-1074.

0 引言

骨髓来源的间充质干细胞是一类具有高度自我更新和多向分化潜能的干细胞, 在相应的体外培养条件下具有向成骨、软骨、肌腱、肌肉、脂肪细胞分化的潜能, 且增殖能力强^[1-3]。目前骨髓间充质干细胞是骨组织工程理想的种子细胞^[4-5]。正常情况下骨髓中骨髓间充质干细胞占有核骨髓细胞的0.000 1%-0.1%, 含量很低。由于组织工程需要大量的种子细胞, 从动物骨髓分离骨髓间充质干细胞的技术上的难度限制了许多实验的开展^[6]。因此体外分离培养纯度高、活力强、生物特性均一的骨髓间充质干细胞对组织工程及细胞的体内、体外实验显得至关重要。实验采用全骨髓贴壁法将骨髓间充质干细胞从骨髓中分离出来, 并在体外进行培养和扩增, 观察其增殖、生长特性和成骨诱导分化潜能。以此建立一套稳定有效、重复性好的骨髓间充质干细胞体外分离、培养、扩增和成骨诱导分化的方法, 为骨组织工程的种子细胞的获取奠定实验基础。

1 材料和方法

设计: 细胞学体外观察实验。

时间与地点: 于2011年6月至2012年2月在广西医科大学医学实验中心完成。

材料:

主要试剂与仪器:

Main reagents and instruments:

试剂与仪器	来源
低糖 DMEM	Hyclone
胎牛血清	浙江天抗生物科技有限公司
青霉素、链霉素溶液、2.5 g/L 胰酶	北京吉诺恩泰生物科技有限公司
1,25-(OH) ₂ VitD ₃ 、地塞米松、左旋抗坏血酸、β-甘油磷酸钠	Sigma
碱性磷酸酶试剂盒	GENERAY
倒置相差显微镜	OLYMPUS
透射电镜	日立 H7650
扫描电镜	VEGA3 TESCAN, 捷克

实验动物: 4周龄纯种新西兰大白兔1只, 体质量1 kg, 购自广西医科大学实验动物中心提供, 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^[7]。

实验方法:

骨髓间充质干细胞的分离培养及纯化^[8]: 30 g/L 戊巴比妥钠按 1 mL/kg 剂量经兔耳缘静脉行全身麻醉。常规消毒铺巾, 于双侧胫骨近端作骨穿, 穿刺成功后用含有 0.5 mL 肝素钠盐水的注射器抽取骨髓 4.0–5.0 mL, 将骨髓转移至离心管, 再加入等量的 PBS 洗涤后以 1 000 r/min, 离心 5 min, 弃去上清液, 加入培养基重悬后接种于 100 mL 的培养瓶中, 于 37 °C、体积分数 5%CO₂ 的培养箱中培养, 3 d 后全量换液, 去除悬浮细胞。原代培养细胞长满瓶底面积 80%–90%时, 加入 2.5 g/L 胰蛋白酶消化 2.0–3.0 min, 加入含有血清的 LG-DMEM 培养基终止消化。1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 吹打细胞后以 1:3 接种。倒置相差显微镜下观察细胞的形态及生长状况。

骨髓间充质干细胞的鉴定: 参考文献[6]的方法鉴定骨髓间充质干细胞。

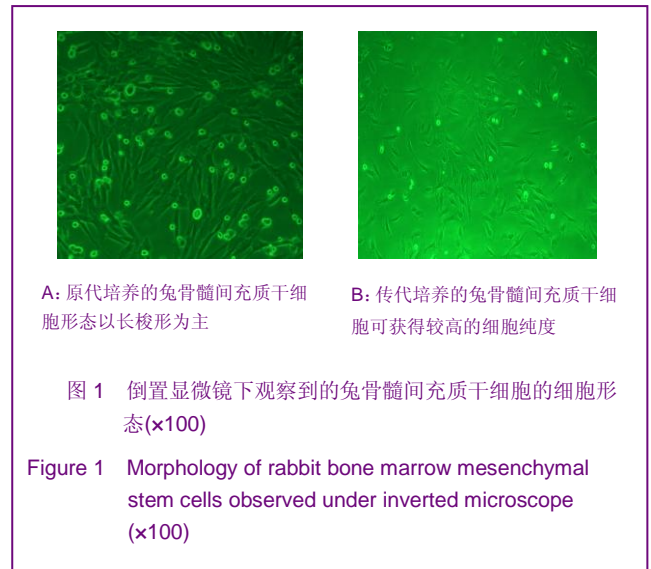
兔骨髓间充质干细胞向成骨细胞诱导分化: 取生长良好的第 3 代兔骨髓间充质干细胞, 2.5 g/L 胰蛋白酶消化, 1 000 r/min, 离心 5 min, 一部分细胞重悬后接种在 100 mL 培养瓶中, 剩余细胞重悬后计数, 以 $5 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 接种于放置有经多聚赖氨酸处理玻片的 6 孔板中, 待细胞长到容器底部的 60%时加入含体积分数 10%胎牛血清, 0.01 $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松、10 mmol/L β -甘油磷酸钠、50 $\mu\text{mol/L}$ 左旋抗坏血酸和 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 1, 25-(OH)₂VitD₃ 的条件培养基, 每 3 d 换液 1 次。倒置相差显微镜下观察细胞形态及钙结节的形成情况, 于诱导 7 d 后行 I 型胶原免疫细胞化学染色, 诱导 14 d 后进行碱性磷酸酶染色, 诱导 21 d 后通过电镜检测诱导后兔骨髓间充质干细胞的表面结构及超微结构, 21 d 后行茜素红 S 染色及 von-kossa 染色对兔骨髓间充质干细胞成骨分化情况进行鉴定。

主要观察指标: ①兔骨髓间充质干细胞培养及纯化结果。②兔骨髓间充质干细胞成骨诱导分化后的鉴定结果。

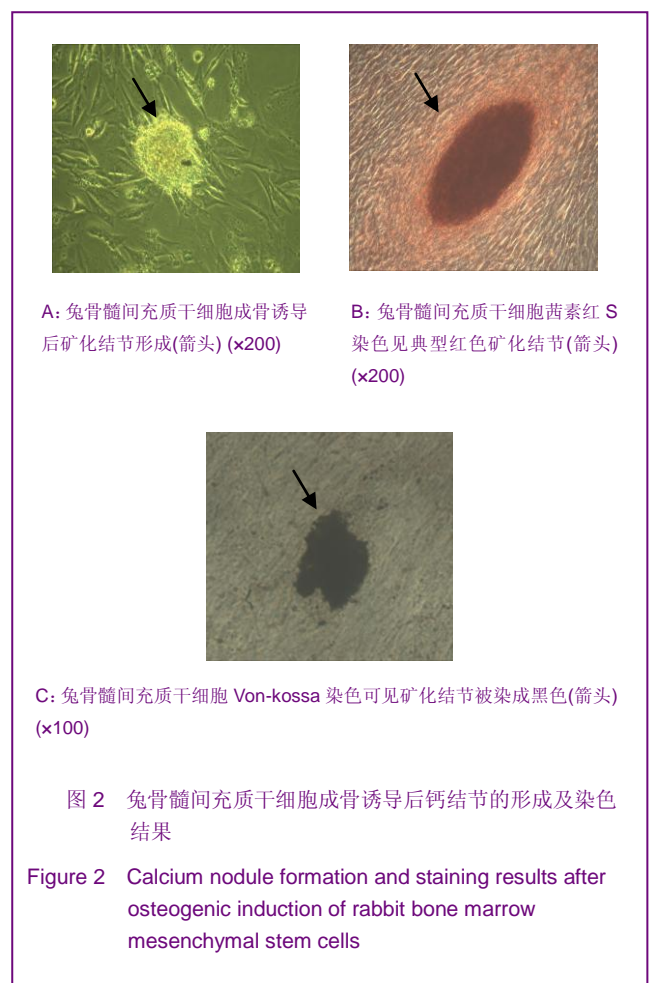
2 结果

2.1 兔骨髓间充质干细胞培养及纯化结果 原代培养 24 h 后见部分细胞开始贴壁, 48 h 后见较多细胞贴壁,

细胞呈短小梭形或多角形, 排列不规则, 可发现较多的造血细胞。培养 5–7 d, 细胞生长迅速并互相融合达 70%–80%, 细胞形态以长梭形为主, 见图 1A, 通过传代, 换液后可获得较高的细胞纯度, 见图 1B。



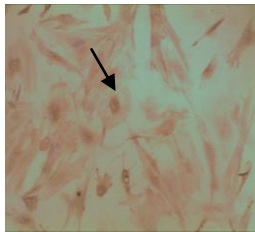
2.2 兔骨髓间充质干细胞成骨诱导分化后的鉴定结果 茜素红 S 染色及 Von-kossa 染色: 见图 2。



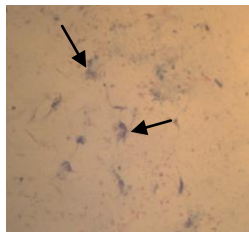
成骨诱导培养后1周, 细胞有梭形转变到多角形或星形, 且细胞体积有所增大, 诱导21 d后出现矿盐沉积形成矿化结节, 见图2A; 茜素红S染色见典型红色矿化结节, 见图2B; Von-kossa染色可见矿化结节被染成黑色, 见图2C。

I型胶原免疫细胞化学染色及碱性磷酸酶染色: 成骨诱导后7 d后 I 型胶原表达出现阳性反应, 细胞胞浆被染成黄褐色, 见图3A。

成骨诱导14 d后碱性磷酸酶染色也出现阳性反应, 细胞胞浆呈蓝黑色, 见图3B。



A: 兔骨髓间充质干细胞成骨诱导后 I 型胶原免疫细胞化学染色阳性(箭头) (×400)



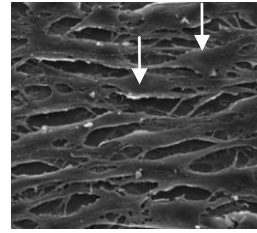
B: 兔骨髓间充质干细胞成骨诱导后碱性磷酸酶染色阳性(箭头) (×200)

图3 兔骨髓间充质干细胞成骨诱导后的 I 型胶原免疫细胞化学染色及碱性磷酸酶染色结果

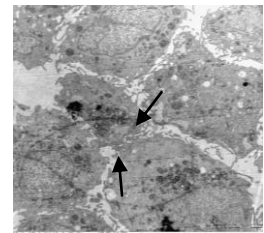
Figure 3 Type I collagen immunohistochemical staining and alkaline phosphatase staining of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells after osteogenic induction

兔骨髓间充质干细胞成骨诱导后的电镜检测: 扫描电镜下见细胞成星形, 胞体增大, 见图4A。

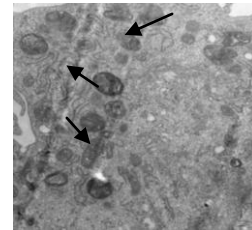
透射电镜下见诱导后细胞核较规则, 常呈圆形或椭圆形。细胞连接紧密, 具有丰富的微绒毛样突起, 交错样排列, 见图4B, 且细胞器丰富, 粗面内质网发达, 线粒体明显增多, 见图4C。



A: 兔骨髓间充质干细胞成骨诱导后扫描电镜下细胞体积变大成多角形(箭头, ×1 000)



B: 兔骨髓间充质干细胞成骨诱导后透射电镜下细胞连接(箭头, ×6 000)



C: 兔骨髓间充质干细胞成骨诱导后细胞内的细胞器丰富, 粗面内质网发达, 线粒体明显增多(箭头, ×20 000)

图4 兔骨髓间充质干细胞成骨诱导后电镜下的观察结果

Figure 4 Electron microscope view of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells after osteogenic induction

3 讨论

20世纪70年代, Friedenstein等^[9]首先报道了成纤维细胞的存在, 这些细胞可以从成人骨髓中分离, 能够在塑料上形成克隆, 当和适当的载体一起移植到皮下的时候可以成骨并且重组一个造血微环境。Owen等^[10]对骨髓基质进行研究发现骨髓间充质干细胞伴随造血系统细胞生长, 且保持自我更新的能力。随着组织工程学的发展, 骨髓间充质干细胞由于来源广泛, 取材方便且具有多向分化潜能, 在不同的培养条件下可向成骨细胞、软骨细胞、肌细胞及神经细胞等分化, 是组织工程理想的种子细胞来源^[11-15]。

目前常用的分离方法有全骨髓贴壁筛选分离法、密度梯度离心法、流式细胞仪和免疫磁珠分离法^[16]。其中流式细胞仪分离法和免疫磁珠分离法对细胞活性影响较大, 实验要求高且需要较多骨髓使其应用受到限制。而密度梯度离心法虽然能够获得纯度高的单核细胞, 但由于多次离心可造成细胞的大量流失且对细胞活性有一定的影响使其应用值得商榷。全骨髓贴壁法是根据骨髓间充质干细胞具有在塑料组织培养瓶中贴壁生长的

特性对其进行分离, 虽然在培养过程中混杂有一定数量的造血干细胞、内皮细胞及成纤维细胞, 但这些杂细胞可通过传代换液去除。目前研究表明, 细胞培养早期骨髓中各种细胞的存在有利于保持骨髓间充质干细胞生长的微环境^[17], 且培养液中存在有少量的造血干细胞及成纤维细胞可通过分泌相关细胞生长因子产生协同作用促进骨髓间充质干细胞的生长存活。

近年来, 骨髓间充质干细胞作为骨组织工程的种子细胞受到广泛关注, 如何在体外将骨髓间充质干细胞成功诱导成具有成骨细胞特性且仍保持细胞活力至关重要。骨髓间充质干细胞在分化过程中受到很多因素的影响, 包括自身因素和环境因素。自身因素中最主要的是控制基因表达的转录因子。

目前研究较多的自身调控因素主要为Cbfa1转录因子(急性骨髓性白血病因子3), 在生物进化中高度保守的细胞核内转录因子Cbfa1是成骨细胞分化和骨形成过程中的控制基因, 在去除老鼠的Cbfa1基因后, 成骨细胞分化完全受抑制, 使骨骼的软骨内骨化成骨和膜内骨化成骨均不能发生^[18]。

环境因素主要包括骨形态发生蛋白、维生素、激素和重力因素等。骨形态发生蛋白主要通过增加细胞内骨桥蛋白、骨钙素及I型胶原蛋白及增高碱性磷酸酶的活性来促进细胞分化^[19]。1, 25(OH)₂vitD₃是维生素D活性代谢产物, 其作用通过维生素D受体介导, 诱导其向成骨细胞分化且能抑制成骨细胞凋亡, 促进骨髓间充质干细胞成骨标记物I型胶原蛋白、骨桥蛋白及碱性磷酸酶的分泌^[20-21]。地塞米松是成骨诱导剂不可缺少的成分, 其不仅促进骨髓基质细胞生长和分化, 而且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。值得注意的是骨髓间充质干细胞成骨分化对地塞米松具有浓度依赖性, 低浓度促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化, 高浓度使其向脂肪细胞分化, 研究表明10⁻⁸ mol/L时促成骨分化作用最明显^[22]。β-甘油磷酸盐和抗坏血酸同样也是成骨分化不可或缺的条件。因为β-甘油磷酸盐可提供磷离子作为磷酸酶作用的底物, 诱导和激活碱性磷酸酶, 促进有机磷向无机磷转化及矿盐沉积及钙化, 是骨髓间充质干细胞发生矿化结节沉积的必要条件^[23]。Coelho等^[24]认为骨髓基质细胞只有在β-甘油磷酸钠存在的情况下才可以发生矿化结节的沉积; 抗坏血酸是细胞合成胶原不可或缺的成分, 不仅可以促进

细胞贴壁并调节碱性磷酸酶活性^[25]。

实验采用经典的成骨诱导方案, 在体外二维培养体系中加入含10 nmol/L地塞米松、50 μmol/L抗坏血酸、10 mmol/L β-甘油磷酸钠、0.1 μmol/L 1, 25-(OH)₂VitD₃的成骨诱导剂, 成骨诱导7 d后I型胶原免疫细胞化学染色呈阳性; 诱导14 d后碱性磷酸酶染色阳性; 诱导21 d后细胞表面出现钙盐沉积及矿化结节, 茜素红及von-kossa染色均呈阳性, 表明骨髓间充质干细胞在成骨诱导剂的作用下具有向成骨分化的特性; 同时在骨髓间充质干细胞成骨诱导21 d后, 作者在电镜下观察细胞表面结构及内部超微结构, 发现成骨诱导后的兔骨髓间充质干细胞体积增大, 呈平铺状态, 细胞核较规则, 常呈圆形或椭圆形; 细胞连接紧密, 具有丰富的微绒毛样突起, 交错样排列; 细胞内可见高电子密度且, 细胞器丰富, 粗面内质网发达, 线粒体明显增多。王志顺等^[26]和潘生才等^[27]的研究都发现骨髓间充质干细胞在成骨诱导后细胞核及粗面内质网较丰富, 可见线粒体, 空泡, 糖原颗粒; 经成骨诱导后线粒体及粗面内质网明显增多, 空泡及糖原颗粒增加, 细胞内可见高电子密度。实验结果与上述两位研究者的实验结果吻合。

实验通过全骨髓贴壁法培养兔骨髓间充质干细胞, 操作简单容易, 通过换传代可以获得纯度较高且具有贴壁活性的兔骨髓间充质干细胞, 在成骨诱导剂的作用下, 骨髓间充质干细胞可向成骨细胞分化, 且体外诱导分化的成骨细胞生长良好, 表现出与成骨细胞相似的形态学和生物学特性, 证实骨髓间充质干细胞具有向成骨细胞分化的潜能, 表明骨髓间充质干细胞是可以作为骨组织工程种子细胞, 为进一步利用异种生物衍生骨支架进行三维体系培养并构建生物衍生骨组织工程奠定实验基础。

基金资助: 广西留学回国人员科学基金(桂科回 0832012) “大网膜包裹构建大段血管化组织工程骨实验研究”。

作者贡献: 实验设计者为第二作者, 评估者为第三、四作者, 第一、五、六作者进行实验干预, 均经过系统培训, 未使用盲法评估。

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: 实验过程中对动物处置方法符合2006年科技部《关于善待实验动物的指导性意见》的规定。

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] Lee HS, Huang GT, Chiang H, et al. Multipotential mesenchymal stem cells from femoral bone marrow near the site of osteonecrosis. *Stem Cells*. 2003;21(2):190-199.
- [2] Fisher M, Hyzy S, Goldberg RE, et al. Regeneration of bone marrow after tibial ablation in immunocompromised rats is agedependent. *Bone*. 2010;46(2):396-401.
- [3] 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.
- [4] Butnariu-Ephrat M, Robinson D, Mendes DG, et al. Resurfacing of goat articular cartilage by chondrocytes derived from bone marrow. *Clin Orthop Relat Res*. 1996; 330:234-243.
- [5] Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, et al. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am*. 1994;76(4):579-592.
- [6] Li XF, Zhao JM, Su W, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(10):1721-1725.
李晓峰, 赵劲民, 苏伟, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞的培养与鉴定[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(10):1721-1725.
- [7] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance suggestion of caring 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.
- [8] Abdallah BM, Kassem M. The Use of Mesenchymal (Skeletal) Stem Cells for Treatment of Degenerative Diseases: Current Status and Future Perspectives. *J Cellular Physiology*. 2009; 218(1):9-12.
- [9] Friedenstien AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*. 1970;3(4):393-403.
- [10] Owen M. Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci Suppl*. 1988; 10:63-76.
- [11] Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, et al. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation*. 2003;75 (3):389-397.
- [12] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411):143-147.
- [13] Jiang Y, Jahagirdar B N, Reinhardt R L, et al. Alipulipotency of mesenchymal stem cell derived from adult marrow. *Nature*. 2002;418(6893):41-49.
- [14] Zheng YH, He T, Kuang SJ, et al. Guoji Yiyao Weisheng Daobao. 2010;16(02):129-134.
郑有华, 何滔, 匡世军, 等. 人骨髓间充质干细胞体外分离培养及其生物学特性[J]. 国际医药卫生导报, 2010, 16(02):129-134.
- [15] Dvorakova J, Hruby A, Velebný V, et al. Isolation and characterization of mesenchymal stem cell population entrapped in bone marrow collection sets. *Cell Biol Int*. 2008; 32(9): 1116-1125.
- [16] Jiang H, Xiao ZM. Zhongguo Linchuang Kangfu. 2006;10(45): 118-120.
江华, 肖增明. 骨髓间充质干细胞在骨科疾病修复中的应用[J]. 中国临床康复, 2006, 10(45):118-120.
- [17] Huang T, Meng ZB, Jia BS, et al. Guangdong Yixue. 2010;31(9): 1089-1091.
黄涛, 孟志斌, 贾丙申, 等. 全骨髓贴壁法分离培养rBMSCs及成骨诱导探讨[J]. 广东医学, 2010, 31(9):1089-1091.
- [18] Huang Y, Li YH. Zhongguo Shengwu Gongcheng Zazhi. 2006; 26(5):85-88.
黄艳, 李莹辉. 影响骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的调控因素 [J]. 中国生物工程杂志, 2006, 26(5):85-88
- [19] Hu Z, Peel SA, Ho SK, et al. Role of bovine bone morphogenetic proteins in bone matrix protein and osteoblast-related gene expression during rat bone marrow stromal cell differentiation. *J Craniofac Surg*. 2005;16(6): 1006-1014.
- [20] Morales O, Samuelsson MK, Lindgren U, et al. Effects of 1alpha,25-dihydroxy vitamin D3 and growth hormone on apoptosis and proliferation in UMR 106 osteoblast-like cells. *Endocrinology*. 2004;145(1):87-94.
- [21] van Leeuwen JP, van Driel M, van den Bemd GJ, et al. Vitamin D control of osteoblast function and bone extracellular matrix mineralization. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2011;11(1-3): 199-226.
- [22] Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, et al. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem*. 1997; 64(2):295-312.
- [23] Marie PJ, Fromiguet O. Osteogenic differentiation of human marrow-derived mesenchymal stem cells. *Regen Med*. 2006; 1(4):539-548.
- [24] Coelho MJ, Fernandes MH. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid, beta-glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation. *Biomaterials*. 2000;21(11):1095-1102.
- [25] Maniopoulos C, Sodek J, Melcher AH. Bone formation in vitro by stromal cells Obtained from bone marrow of young adult rats. *Cell Tissue Res*. 1988;254(2):317-330.
- [26] Wang ZS, Wang JY, Wang BZ, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2009;13(1):11-16.
王志顺, 王江泳, 王保芝, 等. 骨髓间充质干细胞向成骨细胞诱导分化的超微结构改变[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(1):11-16.
- [27] Pan SC, Tang YJ, Xie KG, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(32): 5918-5922.
潘生才, 唐毓金, 谢克恭, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞成骨诱导分化的超微结构变化[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(32):5918-5922.