

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.06.005 [http://www.crter.org]

庾佳佳, 汪新柱, 赵琳, 孙瑞, 闫雪萍, 张苍宇, 任广铁, 拓振合. 兔骨髓间充质干细胞的分离培养及成骨诱导[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(6):974-979.

兔骨髓间充质干细胞的分离培养及成骨诱导*★

庾佳佳¹, 汪新柱², 赵琳¹, 孙瑞¹, 闫雪萍³, 张苍宇¹, 任广铁¹, 拓振合¹

1 兰州大学第二医院骨科, 甘肃省兰州市 730030

2 甘肃省中医院放射科, 甘肃省兰州市 730050

3 兰州大学口腔医学院, 甘肃省兰州市 730000

文章亮点:

应用密度梯度离心法(密度为 1.073 g/mL 的 Percoll 分离液, 3 000 r/min×30 min 离心)可成功建立兔骨髓间充质干细胞的分离培养体系, 可定向诱导为成骨细胞。

关键词:

干细胞; 骨髓干细胞; 骨髓间充质干细胞; 密度梯度离心法; 分离培养; 成骨诱导; 骨组织工程; 兔; 国家自然科学基金; 干细胞图片文章

摘要

背景: 骨髓间充质干细胞具有多向分化潜能, 且可大量体外扩增培养, 是重要的组织工程种子细胞。但尚无统一的体外培养及定向诱导方法。

目的: 探讨体外定向诱导兔骨髓间充质干细胞分化为成骨细胞的可行性。

方法: 应用密度梯度离心法从兔四肢骨中分离纯化间充质干细胞, 应用密度为 1.073 g/mL 的 Percoll 分离液, 3 000 r/min×30 min 离心, 区别于相关报道的 Ficoll 分离液, 2 000-2 500 r/min×(20-30) min 离心以及全骨髓培养法体外扩增至第 3 代, 分别在普通培养基(对照组)和成骨诱导培养基(实验组)中培养。

结果与结论: 成功获得大量高纯度骨髓间充质干细胞。经成骨诱导后, 实验组骨钙素含量明显高于对照组($P < 0.05$)。实验组碱性磷酸酶和钙结节染色阳性, 对照组均阴性。结果表明使用密度梯度离心法可成功建立兔骨髓间充质干细胞的分离培养体系, 骨髓间充质干细胞可定向诱导为成骨细胞。

Isolation, culture and osteogenic induction of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells

Yu Jia-jia¹, Wang Xin-zhu², Zhao Lin¹, Sun Rui¹, Yan Xue-ping², Zhang Cang-yu¹, Ren Guang-tie¹, Tuo Zhen-he¹

1 Department of Orthopedics, Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730030, Gansu Province, China

2 Department of Radiology, Gansu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730050, Gansu Province, China

3 School of Stomatology, Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China

Abstract

BACKGROUND: Bone marrow mesenchymal stem cells are important seed cells for tissue engineering because of their multi-directional differentiation potential and possibility to be amplified and cultured *in vitro*. But there have been no uniformed methods of *in vitro* culture and oriented differentiation.

OBJECTIVE: To investigate the feasibility of *in vitro* oriented differentiation of rabbit bone marrow

庾佳佳★, 男, 1985年生, 山西省新绛县人, 汉族, 兰州大学在读硕士, 主要从事骨组织工程研究。
410506133@qq.com

通讯作者: 赵琳, 博士, 主任医师, 兰州大学第二医院骨科, 甘肃省兰州市 730030
bonezl@sina.com

中图分类号: R394.2
文献标识码: A
文章编号: 2095-4344
(2013)06-00974-06

收稿日期: 2012-03-06
修回日期: 2012-05-08
(20120306026/M·S)

Yu Jia-jia★, Studying for master's degree, Department of Orthopedics, Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730030, Gansu Province, China
410506133@qq.com

Corresponding author: Zhao Lin, M.D., Chief physician, Department of Orthopedics, Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730030, Gansu Province, China
bonezl@sina.com

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 30973064*

Received: 2012-03-06
Accepted: 2012-05-08

mesenchymal stem cells into osteoblasts.

METHODS: Rabbit bone marrow mesenchymal stem cells were isolated and purified using density gradient centrifugation (1.073 g/mL Percoll separation solution for centrifugation at 3 000 r/min for 30 minutes, which was different from Ficoll separation solution for centrifugation at 2 000–2 500 r/min for 20–30 minutes as well as whole bone marrow culture method). After *in vitro* amplification, passage 3 bone marrow mesenchymal stem cells were cultured with common culture medium (control group) and osteoblast induction culture medium (experimental group).

RESULTS AND CONCLUSION: A large number of high purity bone marrow mesenchymal stem cells were successfully obtained. After osteogenic induction, the content of osteocalcin in the experimental group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$). Alkaline phosphatase and calcium tubercle staining were positive in the experimental group, but they were negative in the control group. These findings suggest that density gradient centrifugation can be used to isolate and culture rabbit bone marrow mesenchymal stem cells, and using this method, bone marrow mesenchymal stem cells can be induce-differentiated into osteoblasts.

Key Words: stem cells; bone marrow-derived stem cells; bone marrow mesenchymal stem cells; density gradient centrifugation; isolation/culture; osteogenic induction; bone tissue engineering; rabbit; National Natural Science Foundation of China; stem cell photographs-containing paper

Yu JJ, Wang XZ, Zhao L, Sun R, Yan XP, Zhang CY, Ren GT, Tuo ZH. Isolation, culture and osteogenic induction of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(6):974-979.

0 引言

间充质干细胞是一种在体内含量很低的非造血基质细胞, 存在于骨髓和大多数的结缔组织中。来源于骨髓中的间充质干细胞具有很强的自我更新和高度增殖能力, 并且在不同的诱导条件下, 可分化为骨、软骨、脂肪组织和肌肉等间质组织^[1]。此种分化增殖能力在幼年动物来源的骨髓中更为明显^[2-3]。间充质干细胞的这种多向分化能力, 尤其是成骨方向的分化使其在骨组织工程研究中具有独特的优势, 植入体内的间充质干细胞可以向成骨方向分化, 修复各种骨的损伤。骨髓中的间充质干细胞具有取材方便, 体外分离培养较容易, 且自体获取回输后免疫排斥反应较小以及不受伦理限制等优点, 被认为是组织工程的重要种子细胞^[4-5]。由于骨髓组织中除含有骨髓间充质干细胞外, 还含有造血干细胞, 血系细胞, 脂肪细胞, 成纤维细胞等多种细胞成分, 需对骨髓中的间充质干细胞进行分离和纯化。实验在以往研究的基础上, 紧密结合临床, 采用密度梯度离心分离纯化骨髓间充质干细胞并进行体外培养扩增, 同时观察体外成骨诱导培养的细胞生物学性状, 旨在建立和优化骨髓间充质干细胞的分离纯化体系, 探索有关骨髓间充质干细胞诱导分化为成骨细胞的能力和生物学特性, 为进一步临床上应用提供理论依据。

1 材料和方法

设计: 细胞体外观察实验。

时间及地点: 于2010年11月至2011年11月在兰州大学医学院分子生物学实验室完成。

材料:

实验动物: 2周-1月龄清洁级新西兰大白兔6只, 体质量约300 g, 雌雄不拘, 由兰州大学医学院动物房提供。

主要试剂: 低糖/高糖DMEM(Hyclone, USA), 胎牛血清(Hyclone, Australia), 地塞米松、维生素C、 β -磷酸甘油钠(AmreSCO, USA), Percoll分离液(深圳达科为公司), 茜素红(上海中泰化学试剂公司), 兔骨钙素ELISA试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)。

实验方法:

骨髓间充质干细胞的分离培养: 取2周-1月龄清洁级新西兰大白兔6只, 引颈法处死, 于体积分数为75%的乙醇溶液中浸泡15 min。超净台内, 无菌取下四肢长骨, 中间剪断长骨干,

暴露骨髓腔, 以无血清DMEM约20 mL反复冲洗髓腔, 收集冲洗液于培养皿中, 用7号针头反复抽吸, 充分分散细胞, 1 000 r/min×5 min离心, 弃上清, 加入少量DMEM重悬^[6], 沿离心管壁缓慢滴入含等量体积的Percoll(密度为1.073 g/mL)分离液中, 3 000 r/min×30 min离心^[7], 吸取中间白膜层, 加入少量DMEM重悬, 1 000 r/min×5 min离心后, 获取骨髓间充质干细胞, 加入含体积分数为15%胎牛血清的低糖DMEM完全培养基重悬, 接种于50 mL培养瓶中, 置于37 °C、饱和湿度、体积分数为5%CO₂培养箱中, 48 h后首次全量换液^[8], 去除未贴壁细胞, 以后每隔2 d更换1次培养基^[9]。7-9 d后培养瓶中细胞达80%融合成单层, 此时可传代培养。

传代培养: 用含0.25%胰蛋白酶和0.01%EDTA的消化液适量消化2.0-3.0 min^[10], 倒置显微镜下观察大部分细胞突起回缩, 形态近乎圆形时, 加入含血清的DMEM终止消化, 仔细吹打, 收集吹打液, 1 000 r/min×5 min离心, 弃上清, 加入完全培养基, 调整细胞浓度为 $2 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 进行传代培养。每隔2 d更换1次培养基, 传代细胞于两三天时可生长近80%融合, 以此方法继续传代培养。

实验分组: 消化收集生长良好的第3代骨髓间充质干细胞进行分组培养。对照组(普通培养组)细胞置于普通培养基中(低糖DMEM, 体积分数为10%的胎牛血清); 实验组(成骨诱导组)细胞置于成骨诱导培养基中(高糖DMEM, 含体积分数为10%的胎牛血清, 50 mg/L维生素C, $1 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$ 地塞米松^[11], 10 mmol/L β -磷酸甘油钠)。

MTT法绘制生长曲线: 取培养至第3代的骨髓间充质干细胞, 消化离心后, 对照组加入普通培养基, 实验组加入成骨诱导培养基, 均调整细胞浓度至 $1 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$, 接种于6个96孔板中, 每孔细胞悬液200 μL , 入孵箱培养, 于第1, 3, 5, 7, 9天各取1板进行消化, 用MTT法测定每孔吸光度值(A值)。以时间为横坐标, A值为纵坐标绘制细胞生长曲线, 观察其生长趋势。

Gomori钙钴法碱性磷酸酶染色: 对照组和实验组以 $5 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 的细胞浓度接种于6孔板中, 每组各1板, 孔中放置载玻片, 分别加入普通培养基和成骨诱导培养基约5 mL, 每3 d换液1次, 不传代连续培养14 d后, 进行改良钙钴法碱性磷酸酶染色。

ELISA测定骨钙素含量: 调整细胞浓度至 $2 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$, 接种于50 mL培养瓶中, 共20瓶, 对照组和实验组各10瓶, 每3 d换液1次, 培养14 d。于第3, 5, 8, 11, 14天时, 各取2瓶, 消化离心后, 超声细胞破碎仪破碎细胞, 按照ELISA试剂盒说明进行操作, 450 nm波长下测

定吸光度值, 根据标准品和样品的吸光度值, 计算样本中骨钙素水平。

茜素红钙化结节染色: 对照组和实验组以 $5 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 的细胞浓度接种于6孔板中, 每组各1板, 孔中放置载玻片, 分别加入普通培养基和成骨诱导培养基约5 mL, 每隔3 d换液1次, 不传代连续培养21 d后, 取出各自细胞爬片行茜素红钙化结节染色。

主要观察指标: ①倒置显微镜下每日观察细胞形态, 生长及贴附情况。②MTT法检测细胞增殖情况。③成骨诱导后细胞行苏木精-伊红染色观察细胞形态。④钙钴法碱性磷酸酶染色观察细胞胞浆着色程度。⑤ELISA测定骨钙素含量。⑥茜素红钙化结节染色观察钙结节的形态及分布情况。

统计学分析: 应用SPSS 19.0统计软件, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间计量资料比较采用两独立样本t检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 骨髓间充质干细胞形态学观察

原代细胞: 倒置显微镜下, 刚接种后可见培养瓶内大量小圆形悬浮细胞, 轮廓清楚, 24 h后可见大圆形贴壁细胞, 48 h后初期贴壁细胞开始变形, 呈椭圆形或类圆形, 72 h后贴壁细胞开始增殖, 但无明显增多, 细胞形态呈短棒形, 梭形及不规则形, 有部分细胞胞浆形成短小突起。4-6 d后细胞快速分裂增殖, 形成分散的细胞集落, 细胞间成栅栏状连接, 多为成纤维细胞形态。7-9 d后细胞可生长达80%融合。原代细胞生长相对较慢, 形态较多样, 约10 d可融合成单层, 见图1。

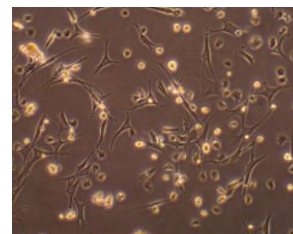


图1 原代细胞接种第3天时, 细胞形态呈短棒形, 梭形及不规则形, 部分细胞成栅栏状连接, 另见较多圆形造血细胞($\times 100$)

Figure 1 Morphological change in primary cultured cells at the 3rd d under the inverted microscope ($\times 100$), showing a short-shuttle-shaped or irregular appearance with paliform-like connections between some cells as well as a large number of round hematopoietic cells ($\times 100$)

传代细胞: 传代培养的细胞生长速度比原代快, 其形态更加统一。接种后2.0-3.0 h即可见细胞贴壁、铺展, 形态恢复梭形, 折光性好。8-10 h细胞基本完全贴壁并均匀分布生长, 不再以集落方式生长, 排列规则, 形态趋于单一, 与成纤维细胞形态类似。三四天后细胞即可铺满80%瓶底面积, 形态呈长梭形, 鱼群状排列, 见图2。连续培养14 d未见明显钙化结节形成。

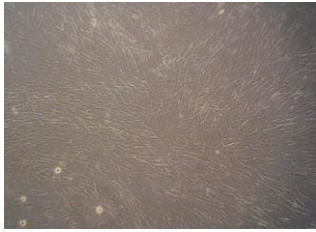


图2 第3代骨髓间充质干细胞, 细胞形态长梭形, 排列规则, 呈鱼群状(x40)

Figure 2 Through the inverted microscopy (x40), passage 3 cultured bone marrow mesenchymal stem cells exhibit a long shuttle-shaped appearance, and arrange in order like a school of fish

成骨诱导培养细胞: 将培养至第3代的骨髓间充质干细胞加入成骨诱导培养基中, 24 h内细胞完全贴壁并开始增殖, 但数目无明显变化, 此为细胞潜伏适应期。72 h起细胞增长迅速但较普通培养基的细胞慢, 至5 d后可长满单层, 逐渐层叠状生长。高密度区的细胞逐渐向成骨细胞转化, 在诱导第7天, 可观察到部分细胞形态由梭形变为立方体和多角形, 体积变大, 此时行苏木精-伊红染色可见典型形态, 见图3。

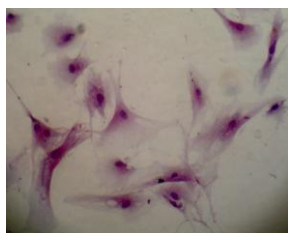


图3 成骨诱导后第7天细胞行苏木精-伊红染色, 细胞形态多为立方体和长三角形, 体积较诱导前变大, 明显向成骨细胞方向发展(x200)

Figure 3 Hematoxylin-eosin staining (x200) shows that at 7 d after osteogenic induction, cells mostly exhibit a cube- or triangle-shaped appearance, and cell volume enlarged compared to before induction, and cells developed toward osteoblasts

约10 d后密集的细胞间可见散在的、较多的致密圆

形团块, 并可逐渐增大, 团块周围细胞密集程度较高, 细胞轮廓不清晰, 团块中心区逐渐变暗, 透光性差, 有黑沙样物质沉积于细胞周围, 约21 d时形成明显的钙化结节, 见图4。

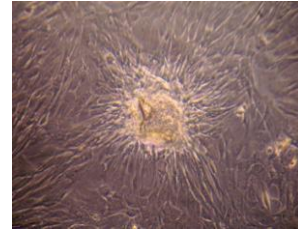
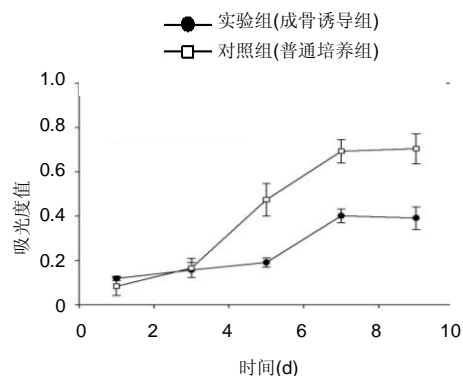


图4 骨髓间充质干细胞成骨诱导第21天时钙化结节形态, 镜下可见白色致密圆形团块, 透光性差, 周围细胞密集(x100)

Figure 4 At 21 d after osteogenic induction of bone marrow mesenchymal stem cells, calcified tubercles appeared to be a white compact round mass, with poor lucency but surrounded by a large number of cells (x100)

2.2 细胞生长曲线 对照组第3代骨髓间充质干细胞生长曲线呈典型的倒“S”形, 传代培养第3天起细胞大量增加, 第7天达到顶点, 进入平台期。实验组曲线显示在成骨诱导第1, 3天, 细胞数目增长不明显, 第5天起大量增加, 第7天达到顶点, 后略有下降, 见图5。



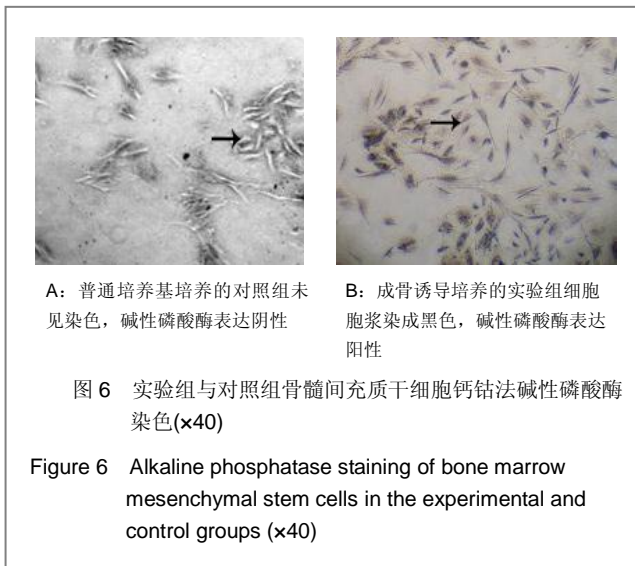
注: 对照组细胞生长曲线呈典型的倒“S”形, 传代培养第3天起细胞大量增加, 第7天达到顶点, 进入平台期。实验组成骨诱导第1, 3天, 细胞数目增长不明显, 第5天起大量增加, 第7天达到顶点, 后略有下降。

图5 实验组与对照组骨髓间充质干细胞生长曲线

Figure 5 Growth curves of bone marrow mesenchymal stem cells between experimental and control groups

2.3 钙钴法碱性磷酸酶染色结果 实验组诱导第2周时, 细胞胞质中可见浅棕色至棕黑色的细小颗粒, 细胞着色程度不一, 细胞密集处反应强烈。对照组细胞形态

仍为成纤维细胞样, 钙钴法染色均不着色, 见图6。



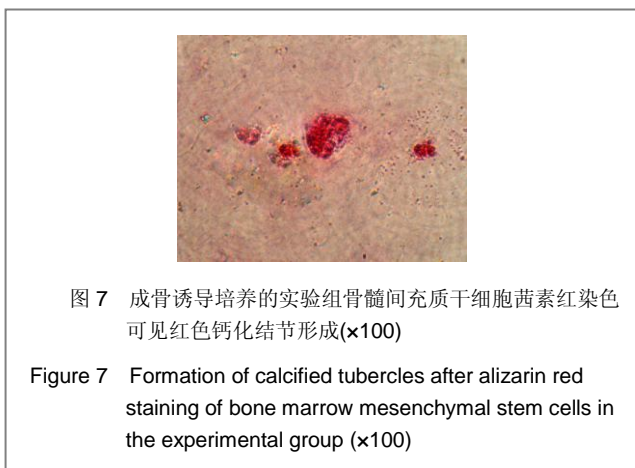
2.4 ELISA测定骨钙素水平 骨髓来源的干细胞经成骨诱导约2周后, 可大量分泌骨钙素, ELISA测定其含量是检测成骨细胞的可靠方法。结果显示实验组骨钙素含量明显升高, 成骨诱导后第5天骨钙素含量便明显高于对照组, 并且随着诱导时间的延长, 含量持续升高, 见表1。

表1 实验组与对照组骨髓间充质干细胞骨钙素水平的测定

Table 1 Determination of osteocalcin between experimental and control groups ($\bar{x} \pm s, n=10, \mu\text{g/L}$)

时间	对照组(普通培养)	实验组(成骨诱导培养)	P
3 d	0.72±0.05	0.83±0.11	< 0.05
5 d	0.95±0.03	2.73±0.05	< 0.05
8 d	1.28±0.08	3.86±0.04	< 0.05
11 d	1.41±0.18	5.03±0.47	< 0.05
14 d	1.49±0.05	5.92±0.79	< 0.05

2.5 茜素红钙化结节染色结果 见图7。



在过度融合状态下, 经成骨诱导约21 d, 细胞表面失去透光性, 可见颗粒状钙盐沉积, 形成钙化结节, 此结节可通过茜素红染色识别。染色结果显示实验组细胞间出现多个致密圆形的深染红色团块, 呈现明显的阳性反应。对照组染色阴性。

3 讨论

骨髓中间充质干细胞的丰度并不高, 仅占有核细胞的0.001%-0.01%^[12], 因此快速分离纯化和大量体外扩增就显得尤为重要。然而骨髓间充质干细胞的分离纯化至今仍无统一的方法^[13]。目前国内外较公认的分选方法有4种, 即密度梯度离心法、全骨髓贴壁培养法、免疫磁珠法和流式细胞仪分选法。由于现在对骨髓间充质干细胞的特异性表面标志物不够明确^[14], 因此很难用免疫磁珠法和流式细胞仪分选法对其进行准确分选, 同时两种分离法的实验要求较高, 所用仪器及试剂昂贵, 难以广泛应用。密度梯度离心法和全骨髓贴壁培养法是分离骨髓间充质干细胞最常见的方法, 作者通过预实验发现, 全骨髓贴壁培养法在培养中混杂较多造血细胞与成纤维细胞, 造成分离纯化程度不够。密度梯度离心法包括Percoll分离液分离法和Ficoll分离液分离法^[15], 二者原理相同, 都是将骨髓组织进行密度分离, 但分离液成分及各自工作液密度不同, Ficoll分离液工作密度为1.077 g/mL^[16]。实验采用密度可调的Percoll分离液, 离心3 000 r/min×30 min后取骨髓细胞悬液中间的白膜层, 所获细胞种类较单一, 减少了分离细胞中杂质细胞的比例, 从而提高了骨髓间充质干细胞的浓度。

骨髓间充质干细胞能否向成骨细胞分化, 在一定程度上取决于所处的培养条件。实验在培养基中加入了骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化所必须的成分, 即维生素C, 地塞米松, β-磷酸甘油钠^[17]。维生素C可促进骨髓间充质干细胞合成胶原进而钙化, 亦能调节三磷酸腺苷和碱性磷酸酶的活性, 且影响其合成。地塞米松既可促进骨髓间充质干细胞分化为成骨细胞, 又可促进碱性磷酸酶的活性、骨钙素及I型胶原的表达^[18]。β-磷酸甘油钠提供大量的磷酸离子, 增加碱性磷酸酶在成骨细胞中的表达, 促进生理性钙盐的沉积^[19]。碱性磷酸酶染色和骨钙素水平的测定是检测成骨细胞活性的特异性方法。碱性磷酸酶是一种已被肯定的参与钙化成骨活动的酶类, 释放无机磷, 促进羟基磷灰石的形成, 是反映成骨过程的重要指标。成骨细胞分泌多种非胶

原蛋白,以骨钙素最具特征。骨钙素由成熟的成骨细胞合成,对钙有亲和力,在细胞外基质的矿化过程中发挥重要调节作用^[20]。实验结果显示,在诱导条件下,碱性磷酸酶和骨钙素均大量表达,且随着诱导时间的延长,表达持续加强。诱导3周时,出现矿化结节,表明骨髓间充质干细胞成功向成骨细胞分化。

细胞生长曲线显示,对照组中的骨髓间充质干细胞,除原代细胞外,生长较快,形态长梭形,有接触抑制现象。实验组生长速度明显减慢,细胞形态呈立方形,可重叠生长。MTT法绘制生长曲线证实:诱导条件下细胞生长速度减慢,饱和密度下降。

基金资助: 国家自然科学基金项目(30973064)。

作者贡献: 实验设计为第二作者,实验实施第一、三作者,统计学处理为第四作者。第一作者成文,通讯作者审校,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理完全符合动物伦理学标准。

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] Meirelles Lda S, Fontes AM, Covas DT, et al. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009;20(5-6):419-427.
- [2] Harvanová D, Tóthová T, Sarišský M, et al. Isolation and characterization of synovial mesenchymal stem cells. *Folia Biol (Praha).* 2011;57(3):119-124.
- [3] Asumda FZ, Chase PB. Age-related changes in rat bone-marrow mesenchymal stem cell plasticity. *BMC Cell Biol.* 2011;12:44.
- [4] Krut MC, Dhert WJ, Oner FC, et al. Analysis of ectopic and orthotopic bone formation in cell-based tissue-engineered constructs in goats. *Biomaterials.* 2007;28(10):1798-1805.
- [5] de Peppo GM, Sjövall P, Lennerås M, et al. Osteogenic potential of human mesenchymal stem cells and human embryonic stem cell-derived mesodermal progenitors: a tissue engineering perspective. *Tissue Eng Part A.* 2010;16(11):3413-3426.
- [6] Poliseti N, Chaitanya VG, Babu PP, et al. Isolation, characterization and differentiation potential of rat bone marrow stromal cells. *Neurol India.* 2010;58(2):201-208.
- [7] Lubis AM, Sandhow L, Lubis VK, et al. Isolation and cultivation of mesenchymal stem cells from iliac crest bone marrow for further cartilage defect management. *Acta Med Indones.* 2011;43(3):178-184.
- [8] Zou L, Zou X, Chen L, et al. Multilineage differentiation of porcine bone marrow stromal cells associated with specific gene expression pattern. *J Orthop Res.* 2008;26(1):56-64.
- [9] Mai X, Chen L, Zhalagahu, et al. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu.* 2007;11(3): 463-466.
买霞,陈莉,扎拉嘎胡,等.大鼠骨髓间充质干细胞分离培养及其生物学特性观察[J].中国组织工程研究与临床康复,2007,11(3): 463-466.
- [10] Wang CY, Shi L, Xia C, et al. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu.* 2011;15(32): 5896-5900.
王承云,石磊,夏春,等.人骨髓间充质干细胞分离培养方法的改进[J].中国组织工程研究与临床康复,2011,15(32): 5896-5900.
- [11] Kotobuki N, Hirose M, Takakura Y, et al. Cultured autologous human cells for hard tissue regeneration: preparation and characterization of mesenchymal stem cells from bone marrow. *Artif Organs.* 2004;28(1):33-39.
- [12] Mostafa NZ, Uludağ H, Varkey M, et al. In vitro osteogenic induction of human gingival fibroblasts for bone regeneration. *Open Dent J.* 2011;5:139-145.
- [13] Augello A, Kurth TB, De Bari C. Mesenchymal stem cells: a perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niches. *Eur Cell Mater.* 2010;20:121-133.
- [14] Sotiropoulou PA, Perez SA, Salagianni M, et al. Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2006;24(2):462-471.
- [15] McQuillan DJ, Richardson MD, Bateman JF. Matrix deposition by a calcifying human osteogenic sarcoma cell line (SAOS-2). *Bone.* 1995;16(4):415-426.
- [16] Xie F, Teng L, Cai L, et al. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu.* 2010;14(6): 951-956.
解芳,滕利,蔡磊,等.犬骨髓间充质干细胞分离纯化和成骨诱导分化:Ficoll液密度梯度离心法体外分离的可行性[J].中国组织工程研究与临床康复,2010,14(6): 951-956.
- [17] Mostafa NZ, Uludağ H, Varkey M, et al. In vitro osteogenic induction of human gingival fibroblasts for bone regeneration. *Open Dent J.* 2011;5:139-145.
- [18] 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.
- [19] Fiorentini E, Granchi D, Leonardi E, et al. Effects of osteogenic differentiation inducers on in vitro expanded adult mesenchymal stromal cells. *Int J Artif Organs.* 2011;34(10): 998-1011.
- [20] Peister A, Mellad JA, Larson BL, et al. Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. *Blood.* 2004;103(5):1662-1668.