

兔骨髓间充质干细胞向成骨细胞诱导分化的不同培养方法

王 辉¹, 张建军² (¹冀中能源邢台矿业集团总医院急诊科, 河北省衡水市 054000; ²天津市第四中心医院神经外科, 天津市 300071)

文章亮点:

1 实验的特点在于: 采用来源广泛的骨髓间充质干细胞向成骨细胞诱导分化; 对兔骨髓间充质干细胞向成骨细胞诱导分化的多种方法进行比较; 使用自体富血小板血浆替代异种血清培养骨髓间充质干细胞。
2 实验结果显示, 使用自体富血小板血浆替代异种血清培养骨髓间充质干细胞是一种安全可靠、操作简单、纯度活性高的诱导骨髓间充质干细胞的成骨分化方法。

关键词:

干细胞; 骨髓干细胞; 自体富血小板血浆; 骨髓间充质干细胞; 胎牛血清; 生长曲线

主题词:

干细胞; 间质干细胞; 富血小板血浆; 幼牛血清

摘要

背景: 目前传统骨髓间充质干细胞的培养方法是应用异种血清为培养基, 但其存在种间疾病传播、潜在免疫排斥反应甚至是伦理学争议等问题; 且与卫生部公布的《组织工程化组织移植治疗技术规范》的要求相违背。自体富血小板血浆是生物自体的全血提取物, 内含多种且含量丰富的生长因子。

目的: 使用自体富血小板血浆替代传统异种血清, 探讨其对兔骨髓间充质干细胞诱导分化为成骨细胞的影响, **方法:** 从兔髂后上棘穿刺抽出 8 mL 骨髓并加肝素抗凝, 密度梯度离心富集骨髓间充质干细胞, 分为自体富血小板血浆组、胎牛血清组, 分别加入含 10% 自体富血小板血浆、体积分数 10% 胎牛血清。在传至 4 代时将自体富血小板血浆组和胎牛血清组细胞各自分为实验组和对照组, 实验组对培养及成分进行改变; 对照组培养基不变。通过生长曲线测定各代细胞的增殖情况; 通过对各组细胞进行碱性磷酸酶活性测定, 判断其成骨分化状况。

结果与结论: 骨髓间充质干细胞生长曲线可见各代细胞增殖良好。对第 4 代各组细胞进行碱性磷酸酶活性检测, 培养第 12 天, 第 4 代自体富血小板血浆实验组及胎牛血清实验组的碱性磷酸酶活性均显著高于其相应对照组; 自体富血小板血浆组对照组、实验组碱性磷酸酶活性显著高于胎牛血清组的对照组、实验组, 差异有显著性意义($P < 0.01$)。提示使用自体富血小板血浆替代异种血清培养骨髓间充质干细胞是一种安全可靠、操作简单、纯度活性高的诱导骨髓间充质干细胞的成骨分化方法。

王辉, 张建军. 兔骨髓间充质干细胞向成骨细胞诱导分化的不同培养方法[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(41): 6609-6613.

The different methods to induce the osteogenic differentiation of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells

Wang Hui¹, Zhang Jian-jun² (¹Department of Emergency, Jizhong Energy Xingtai MIG General Hospital, Hengshui 054000, Hebei Province, China; ²Department of Neurosurgery, Tianjin 4th Centre Hospital, Tianjin 300071, China)

Abstract

BACKGROUND: At present, heterologous serum as a medium is a common method for culture of bone marrow mesenchymal stem cells, but it is limited by the disease transmission between species, the potential immune rejection and even controversial ethic issues. This method is also contrary to the requirements of the Ministry of Health. Autologous platelet-rich plasma is a kind of whole blood extract, containing a variety of growth factors.

OBJECTIVE: To explore the osteogenic differentiation of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells cultured in autologous platelet rich plasma alternative to traditional heterogeneous serum-free culture.

METHODS: 8 mL bone marrow from the rabbit iliac crest was extracted and anti-coagulated with heparin, and then bone marrow mesenchymal stem cells were isolated using density gradient centrifugation. The cells were divided into autologous platelet rich plasma group (10% autologous platelet rich plasma) and fetal bovine serum group (10% fetal bovine serum). At the passage 4, the cells in the two groups were respectively subdivided into experimental and control groups. Experimental groups were subjected to osteogenic induction, while no change was done in the control groups. Cell proliferation was determined by using growth curves; the activity of alkaline phosphatase was detected to adjust the osteogenic differentiation of cells in different groups.

RESULTS AND CONCLUSION: Bone marrow mesenchymal stem cells at different generations all showed good proliferation. At 12 days of autologous platelet rich plasma culture, the activity of alkaline phosphatase in the passage 4 cells in the experimental group was significantly higher than that in the control group; while the activity of alkaline phosphatase in the autologous platelet rich plasma group was significantly higher than that in the fetal

王辉, 男, 1973 年生, 河北省武邑县人, 汉族, 2006 年河北医科大学毕业, 主治医师。

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.

2014.41.009

[http://www.crter.org]

中图分类号:R394.2

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2014)41-06609-05

稿件接受: 2014-08-07

Wang Hui, Attending physician, Department of Emergency, Jizhong Energy Xingtai MIG General Hospital, Hengshui 054000, Hebei Province, China

Accepted: 2014-08-07

bovine serum group ($P < 0.01$). These findings indicate that autologous platelet rich plasma as a substitute of xenogeneic serum for culture of bone marrow mesenchymal stem cells is a method characterized as safe and reliable, simple operation, high-purity active induction.

Subject headings: bone marrow; mesenchymal stem cells; platelet-rich plasma; actihaemyl

Wang H, Zhang JJ. The different methods to induce the osteogenic differentiation of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014;18(41):6609-6613.

0 引言 Introduction

临床骨科治疗过程中骨缺损, 尤其是大型的骨缺损的治疗, 因为局部伤情的复杂以及缺乏理想的修复材料, 一直是困扰着临床医生和基础医学工作者的研究热点及难题之一, 而寻找一种理想的骨替代材料, 尽可能的能达到或接近自体骨移植效果的材料更是无数科研工作者热切探索、孜孜以求的目标。近年来日趋活跃的骨组织工程(bone tissue engineering)技术为这一课题的研究带来了新的亮点和希望。组织工程骨的构建又可以分为体内构建和体外构建两种形式, 体内构建是将成骨细胞-支架复合物植入体内, 修复骨缺损。体外构建则是通过体外组织培养的方法应用水降解支架材料, 接种成骨细胞, 构建骨组织。目前动物实验已能从骨膜、骨髓等定向性骨祖细胞密集处分离培养出成骨细胞, 经体外扩增并与载体结合, 回植体内骨缺损处取得骨缺损修复的成功^[1-3]。与此同时, 基于对患者易接受性、可操作性及更简单易行性等方面的考虑, 研究者又开始把目光投向诱导性骨祖细胞。许多研究表明, 骨髓间充质干细胞易于获取, 可诱导分化为多种细胞, 骨髓来源的间充质干细胞可以分化为神经元样细胞、肝细胞、胰岛素产生细胞、软骨细胞、成骨细胞等, 并且易于被外源基因转染并稳定表达, 在组织工程细胞替代治疗中有极其广泛的应用前景, 具有取材容易、多向分化潜能、少免疫排斥反应、容易体外扩增等优点, 对其分化为成骨细胞的研究颇多, 但其分化结果都不十分理想。

目前传统的骨髓间充质干细胞培养方法是应用异种血清为培养基进行培养^[1-3], 但存在种间疾病传播、潜在免疫排斥反应甚至是伦理学争议等问题; 且与卫生部公布的《组织工程化组织移植治疗技术管理规范》的要求相违背^[2-5]。自体富血小板血浆是生物自体的全血提取物, 内含多种且含量丰富的生长因子; 目前已知的有血小板衍生生长因子、类胰岛素生长因子和转化生长因子 β 等。于是作者使用自体富血小板血浆替代异种血清, 通过实验探究其对兔骨髓间充质干细胞诱导分化为成骨细胞的影响, 探讨诱导骨髓间充质干细胞成骨分化的新方法。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 细胞学水平, 对比观察实验。

时间及地点: 于2012年1月至2013年11月在河北医科大学分子生物学实验室(BSL-2)完成。

材料: 新西兰大白兔10只, 体质量2.0-2.5 kg, 雌雄

各5只, 由河北医科大学动物饲养中心提供, 许可证号: SYXK(京)2011-0039。实验过程中对动物的处置符合2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

兔骨髓间充质干细胞向成骨细胞诱导分化培养实验的主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
胎牛血清	杭州四季青公司
碱性磷酸酶试剂盒	南京建成公司
矿化诱导因子	美国西格玛公司
DMEM-F12培养基	美国拜力公司
胰蛋白酶	美国Gibco BRL公司
地塞米松注射液	吉林精优长白山药业有限公司
β -甘油磷酸钠	上海研域生物科技有限公司
碱性磷酸酶染色试剂盒	北京雷根生物技术有限公司
CO ₂ 培养箱	英国RS Biotech公司
超净工作台	苏州安泰空气技术公司
荧光倒置显微镜	日本Nikon公司

方法:

自体富血小板血浆的制备: 抽取兔耳中央动脉血10 mL 移入EDTA抗凝管中^[6-8], 分别采用2次及3次离心法对兔血进行离心。2次离心法: ①使用离心机以2 400 r/min离心10 min, 超净台内枪头吸取全部上清液、白膜层及以下2 mm 的红细胞层, 置入另一EDTA抗凝管中。②以3 600 r/min离心15 min, 吸弃管内上层3/4上清液, 剩余液体约1.0 mL, 将剩余液体摇匀即为富血小板血浆。3次离心法: 将2次离心法中的步骤①重复2次, 其余与2次离心法相同。

骨髓间充质干细胞的分离、培养及成骨分化^[9-13]: 从兔髂后上棘穿刺抽出8 mL骨髓并加肝素抗凝, 密度梯度离心富集骨髓间充质干细胞, 标记为原代, 分为自体富血小板血浆组、胎牛血清组, 分别使用含10%自体富血小板血浆、体积分数10%胎牛血清, 使用美国拜力公司DMEM-F12培养基, 置于37 °C, 体积分数10%CO₂饱和湿度培养箱中进行培养。细胞融合达85%以上时, 使用胰蛋白酶消化传代, 以1:3比例传代培养。对原代及传代细胞生长状态进行检测, 绘制细胞生长曲线。在传至4代时将自体富血小板血浆组和胎牛血清组细胞各自分为实验组和对照组, 实验组对培养及成分进行改变, 在原培养基中加入美国西格玛公司的矿

化诱导因子, 调整地塞米松浓度至 1×10^{-2} mol/L、 β -甘油磷酸钠浓度至 1×10^{-2} mol/L和加入500 μ g/L维生素C; 对照组培养基不变。

骨髓间充质干细胞碱性磷酸酶活性测定: 对第4代各组细胞按 5×10^4 /孔接种在2个36孔板上, 每组12孔, 依然使用原来所使用的培养基进行培养。在第0, 4, 8, 12天收集细胞进行碱性磷酸酶活性检测, 每次等间距收集3孔。以0.01 mol/L磷酸盐缓冲液(pH 7.4)洗各培养孔3次, 然后加入Triton X-100 100 μ L, 4 $^{\circ}$ C过夜, 每孔加入碱性磷酸酶底物液150 μ L, 37 $^{\circ}$ C孵育30 min, 以1 mol/L KOH终止反应, 酶联免疫监测仪测410 nm波长的吸光度。

钙结节测定: 各组细胞诱导10 d后, 将逐渐聚集、形成结节有类似骨结构倾向的细胞进行形态学观测和染色实验。使用茜素红染色来判断局部钙盐沉积, 以此评估成骨分化情况。

主要观察指标: ①各组兔骨髓间充质干细胞原代和传代培养的生长曲线。②根据流式细胞仪结果判断兔骨髓间充质干细胞表型。③自体富血小板血浆对兔骨髓间充质干细胞增殖及碱性磷酸酶活性的影响。

统计学分析: 统计学处理者为第一作者王辉, 样本资料采用PEMS 3.1软件处理。资料比较采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 细胞生长曲线 对原代细胞(P1)及传至2, 3, 4代(P2、P3、P4)的传代细胞进行检测, 计算培养细胞个数, 绘制细胞生长曲线, 结果见图1。

2.2 细胞的形态学观察 使用倒置相差显微镜对各组、各代细胞进行形态学观察, 对比文献观察其诱导成骨分化时及分化后的生长、增殖状况及形态学特征并拍照。原代培养至第3天, 细胞开始出现贴壁生长, 细胞呈梭形、多角形外观, 细胞体积逐渐增大, 长宽比约达到至为3:1。培养3-7 d, 细胞覆盖培养皿底部, 成片生长。传代培养2 d后贴壁细胞散乱分布, 呈三角形、多角形、梭形外观, 细胞分裂速度加快, 6-8 d可整齐有序的覆盖培养皿底部, 见图2。流式细胞仪分析结果显示, 细胞CD29, CD90及CD106表达阳性, 阳性率分别为98.9%, 98.6%和92.4%, 符合骨髓间充质干细胞表面标志表达, 见图3。

2.3 碱性磷酸酶表达及形成钙结节能力的检测 在自体富血小板血浆和胎牛血清各组培养基培养后, 使用碱性磷酸酶钙钴法染色后可观测到多半细胞呈现阳性反应, 见图4A, 细胞胞浆可见棕黑色的颗粒。培养2周后, 细胞开始呈现集落聚集生长, 此后逐渐形成钙结节, 在使用茜素红染色时呈现阳性, 可以通过茜素红染成红色, 提示局部钙盐沉积, 诱导成骨分化成功, 见图4B。

2.4 各组碱性磷酸酶活性的测定 对第4代各组细胞进行碱性磷酸酶活性检测, 培养第12天, 第4代自体富血小板

血浆实验组及胎牛血清实验组的碱性磷酸酶活性均显著高于其相应对照组; 自体富血小板血浆组对照组、实验组碱性磷酸酶活性显著高于胎牛血清组的对照组、实验组, 差异有显著性意义($P < 0.01$), 结果见表1。

3 讨论 Discussion

种子干细胞、培养载体和生物调节因子是干细胞成骨分化工程的三大不可或缺的因素^[14-16]。骨髓间充质干细胞是骨髓中存在的一种具有多方向分化潜能的、是成骨细胞前身的原始干细胞^[14-17], 是干细胞成骨分化工程中一种理想的种子干细胞。在一定培养条件下可通过定向培养的方式将其转化为成骨细胞。由于骨髓中间充质干细胞很是稀少, 所以在实验或进行临床运用时都是先经过培养繁殖达到一定数量后, 再进行相应的应用。

自体富血小板血浆是生物自体的全血提取物, 内含多种且含量丰富的生长因子^[15-19]; 目前已知的有血小板衍生生长因子、类胰岛素生长因子和转化生长因子 β 等^[20-24]。其具有促进间充质干细胞增殖、分化及合成分泌胶原蛋白等作用。本实验通过自体富血小板血浆替代牛胎血清培养骨髓间充质干细胞, 结果表明自体富血小板血浆能向牛胎血清一样具有促进干细胞增殖并启动其成骨分化过程的作用。随着组织工程的发展, 细胞替代疗法将成为一种新的方式来攻克一些疑难病症, 目前已取得了一定的成就。采用自体富血小板血浆是目前临床和科学研究的热点, 自体富血小板血浆中含有多种高浓度的生长因子且生长因子活性能够持续1周^[25-26]。相关研究表明自体富血小板血浆具有促进骨组织的再生和软组织的修复的作用。综合分析自体富血小板血浆同时具有以下几点优势, 其在临床及科学研究中应该会有广泛的应用前景: ①自体富血小板血浆取自于自体, 从根本上解决了临床及科研中的免疫排斥难题。②自体富血小板血浆中含有多种高浓度的生长因子, 且各种生长因子的比例与体内正常比例相符能够起到最佳的协同作用, 效果明显优于单一生长因子或两种生长因子应用的效果。③对患者损伤小, 只要严格无菌操作, 并发症少甚至不会发生并发症。④自体富血小板血浆的制作简单, 手工制作一般在1 h内可以完成。⑤不存在伦理学及法律纠纷问题。⑥经济, 可为患者省钱, 也可节约医药资源^[27-34]。

碱性磷酸酶是成骨细胞分化标志物之一^[35-37], 其活性出现于诱导早期, 随着诱导时间延长而增加, 与细胞的成骨分化程度呈正相关。作者对第4代各组细胞进行碱性磷酸酶活性检测, 自体富血小板血浆实验组及胎牛血清实验组的碱性磷酸酶活性均显著高于其相应对照组; 自体富血小板血浆对照组、实验组的碱性磷酸酶活性高于相应胎牛血清组的对照组、实验组, 差异有显著性意义。本实验结果显示, 自体富血小板血浆组和胎牛血清组细胞随着诱导时间延长, 碱性磷酸酶活性逐渐升高, 12 d后趋于稳定, 说明两种方式对于干细胞的成骨分化都有良好的效果。

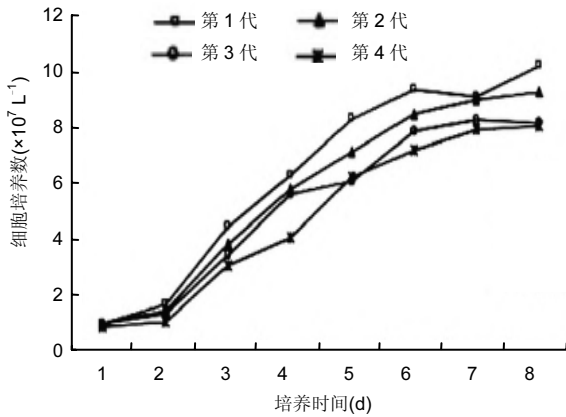


图1 原代及传代骨髓间充质干细胞的培养生长曲线
Figure 1 Growth curves of primary and passaged bone marrow mesenchymal stem cells
图注: 可见各代细胞增殖良好。

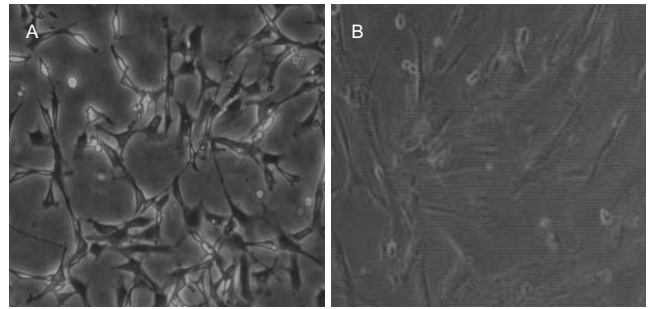


图2 原代培养3 d及传代培养3 d骨髓间充质干细胞贴壁细胞形态(x100)
Figure 2 Morphology of adherent cells after 3-day primary culture or 3-day subculture (x100)
图注: 图中A示原代培养3 d, 贴壁细胞为多角形、梭形; B示传代培养3 d, 贴壁细胞为三角形、多角形、梭形。

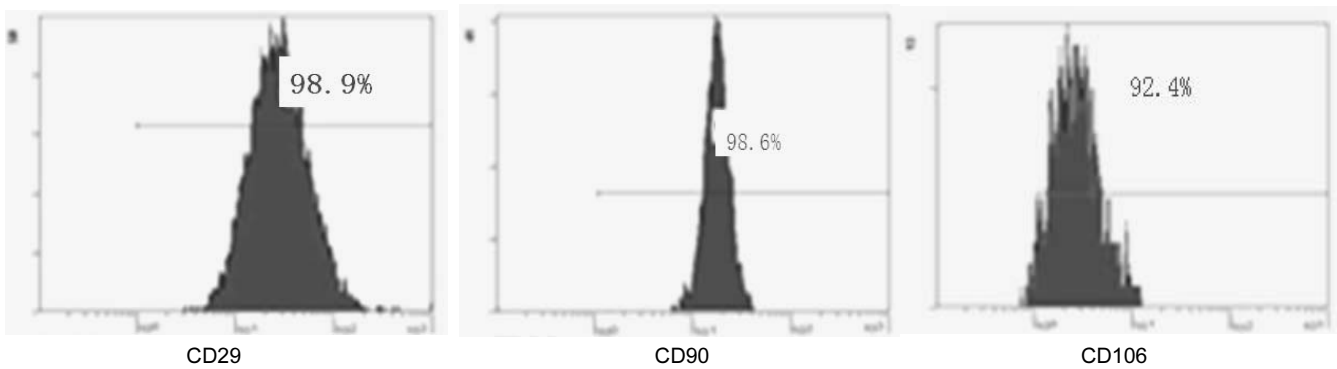


图3 骨髓间充质干细胞抗原表达阳性率流式细胞仪检测结果
Figure 3 Phenotypes of rat bone marrow mesenchymal stem cells by flow cytometry
图注: 流式细胞仪分析结果显示, 细胞CD29, CD90及CD106表达阳性, 阳性率分别为98.9%, 98.6%和92.4%表达, 符合骨髓间充质干细胞表面标志的表达。

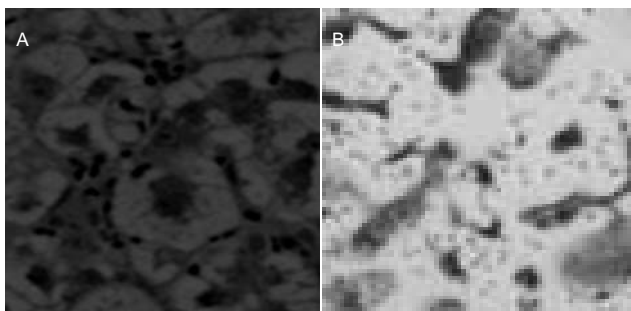


图4 骨髓间充质干细胞的碱性磷酸酶钙钴法及茜素红染色结果(x100)
Figure 4 Calcium cobalt method and alizarin red staining for detection of alkaline phosphatase in bone marrow mesenchymal stem cells (x100)
图注: 图中A示使用碱性磷酸酶钙钴法染色后可观察到多半细胞呈现阳性反应, 细胞浆可见棕黑色的颗粒; B示通过茜素红染成红色, 提示局部钙盐沉积, 诱导成骨分化成功。

钙盐沉积是诱导骨髓间充质干细胞成骨分化成功的直接证据^[38-41]。作者通过对自体富血小板血浆组和胎牛血清组细胞诱导10 d后逐渐聚集、形成结节有类似骨结构倾向的细胞进行形态学观测和染色实验^[41]。通过使用茜素红染成红色, 显示局部钙盐沉积, 得到成骨分化成功与否的结论。

表1 各组骨髓间充质干细胞碱性磷酸酶活性的测定
Table 1 Activity of alkaline phosphatase in the bone marrow mesenchymal stem cells (x̄±s, nkat/L)

培养时间(d)	自体富血小板血浆对照组	自体富血小板血浆实验组	胎牛血清对照组	胎牛血清实验组
0	987.45±12.4	986.73±10.6	843.65±13.6	843.66±15.7
4	1 237.28±16.2	1 694.38±17.6	849.42±14.4	1 423.62±21.4
8	1 632.67±21.3	2 845.90±24.6	852.54±17.0	2 803.54±25.6
12	1 876.76±23.4 ^b	3 487.43±31.5	995.73±17.1 ^{ac}	3 017.00±31.5 ^b

表注: 与自体富血小板血浆对照组比较, ^aP=0.000 0; 与自体富血小板血浆实验组比较, ^bP=0.000 0; 与胎牛血清实验组比较: ^cP=0.000 0。

本实验结果表明, 使用自体富血小板血浆替代异种血清培养出的骨髓间充质干细胞与异种血清培养而来的细胞在形态学大小、碱性磷酸酶活性、及钙盐沉积等生物学特征方面基本一致。说明了其既符合相关规定, 又可避免种间疾病传播、排除潜在免疫排斥反应, 这是一种安全可靠、操作简单、纯度活性高的诱导骨髓间充质干细胞成骨分化的方法。

作者贡献: 实验设计、实施为第一作者, 评估为第二作者,

均经过专业培训,采用盲法评估。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

学术术语: 自体富血小板血浆-是生物自体的全血提取物,内含多种且含量丰富的生长因子;目前已知的有血小板衍生生长因子、类胰岛素生长因子和转化生长因子 β 等。其具有促进间充质干细胞增殖、分化及合成分泌胶原蛋白等作用。

作者声明: 文章为原创作品,无抄袭剽窃,无泄密及署名和专利争议,内容及数据真实,文责自负。

4 参考文献 References

- [1] 安莹,高丽娜,杨昊,等.氯化锂对人牙周膜干细胞增殖和成骨分化的影响[J].牙体牙髓牙周病学杂志,2013,23(1):12-16.
- [2] 刘银梅,张鹏.骨髓间充质干细胞对移植免疫的影响[J].中国组织工程研究与临床康复,2010,14(49):9264-9267.
- [3] 马志兵,袁峰,冯虎,等.自体富血小板血浆对兔骨髓间充质干细胞增殖的影响[J].中华实验外科杂志,2011,28(12):2211-2214.
- [4] 李雪峰,刘亮,王东.大鼠骨髓间充质干细胞体外向成骨细胞分化培养的生物学特性[J].中国组织工程研究与临床康复,2011,15(23):4185-4188.
- [5] 李凌云,杜荣,范熙明.体外培养人骨髓间充质干细胞向表皮细胞分化及表皮细胞角蛋白的表达[J].中国组织工程研究与临床康复,2011,15(36):6661-6664.
- [6] 俞猛,于方,付胜良.兔骨髓间充质干细胞体外培养定向诱导分化为软骨细胞[J].中国组织工程研究与临床康复,2011,15(27):4951-4954.
- [7] 张宁,李放,罗涛.不同抗凝剂和激活剂组合在自体富血小板血浆凝胶支架促进脂肪干细胞增殖的影响[J].军医进修学院学报,2012,33(6):113-115.
- [8] Landesberg R, Roy M, Glickman RS. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. J Oral Maxillofac Surg. 2000;58(3): 297-300.
- [9] Liu J,Zhu H.Human mesenchymal stem cell transplantation protects against cerebral ischemic injury and upregulates interleukin10 expression in Macaca fascicularis. Brain Res. 2010;1334:65-72.
- [10] Zhang J, Li Y, Zhang ZG, et al. Bone marrow stromal cells increase oligodendrogenesis after stroke. J Cereb Blood Flow Metab. 2009;29(6):1166-1174.
- [11] 付洪海,何悦.骨髓间充质干细胞向成纤维细胞分化的研究进展[J].中国口腔颌面外科杂志,2011,9(3):248-251.
- [12] 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(2):129-134.
- [13] 邹翰林,郭永飞,刘岩.骨髓间充质干细胞成骨分化中的微小RNA及Wnt通路[J].中国组织工程研究,2013,17(10):1896-1900.
- [14] 胡苏,逢曙光,崔莹,等.链脲佐菌素诱导糖尿病大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化[J].山东大学学报(医学版),2013,51(8):7-12.
- [15] 王斌,罗毅文,胡年宏.补肾填精法对兔骨折后不同时相骨髓间充质干细胞成骨分化的影响[J].安徽中医学院学报,2013,32(1):66-69.
- [16] 陆细红,邓敏,贺洪辉,等.miR-125b通过靶向抑制Smad4调控骨髓间充质干细胞成骨分化[J].中南大学学报(医学版),2013,38(4):341-346.
- [17] 郭培红,华子义,赵秀娟.姜黄素促进大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化中活性氧表达变化研究[J].中国医药导报,2013,10(18):24-26,29.
- [18] 李文宝,李刚.补肾中药诱导干预骨髓间充质干细胞成骨分化研究进展[J].实用中医药杂志,2013,29(4):324-326.
- [19] 严瀚,徐绘华,郭奇峰,等.重组腺病毒体外诱导山羊骨髓间充质干细胞成骨分化的研究[J].中华显微外科杂志,2013,36(2):156-160.
- [20] 曹钰,杜娟,范志朋.BCOR基因敲除促进骨髓间充质干细胞成骨分化的研究[J].北京口腔医学,2013,21(2):61-64.
- [21] 张新昌,张西正.骨髓间充质干细胞成骨分化相关通路的研究进展[J].医学综述,2013,19(21):3853-3856.
- [22] 汤军,蔡建平,张贤.中药提取物诱导骨髓间充质干细胞成骨分化的研究进展[J].山东中医药大学学报,2013,37(3):257-258.
- [23] 刘燕,张文杰,张秀丽,等.含锶锌黄长石涂层钛表面促进骨髓间充质干细胞成骨分化的初步研究[J].口腔材料器械杂志,2013,22(2):66-70.
- [24] 虞冀哲,杨勇,刘朝旭,等.共培养条件下电磁场干预对大鼠成骨细胞及骨髓间充质干细胞成骨分化的影响[J].中华物理医学杂志,2013,35(4):250-255.
- [25] 张兴安,吴蜀江,卢海彬,等.自体富血小板血浆修复面神经损伤[J].中国组织工程研究,2013,17(28):5145-5150.
- [26] 邓茜,吴小蔚,刘闰男.脂肪干细胞和自体富血小板血浆载体复合体内构建血管化组织工程脂肪的可行性及疗效分析[J].中国医药导报,2013,10(29):24-27.
- [27] 张健,姜鑫,张洪亮.自体富血小板血浆对兔前交叉韧带重建后腱骨愈合组织学影响[J].辽宁医学院学报,2013,34(2):23-26.
- [28] 孟繁星,李放,白煜,等.不同方法制备兔自体富血小板血浆凝胶支架促进脂肪干细胞增殖比较[J].军医进修学院学报,2013,34(6):635-639.
- [29] 王虎,李凡,单臣.自体富血小板血浆注射治疗跟痛症的疗效[J].中国老年学杂志,2013,33(13):3160-3161.
- [30] 贝朝涌,唐际存,王锐英,等.感染骨灭活原位移植自体富血小板血浆复合骨髓治疗慢性骨髓炎[J].实用医学杂志,2012,28(4):558-561.
- [31] 黎洪棉,柳大烈,赵培冉,等.脂肪干细胞与自体富血小板血浆载体复合体内构建血管化组织工程脂肪[J].中国组织工程研究,2012,16(45):8424-8429.
- [32] 胡新锋,王宸,芮云峰.自体富血小板血浆干预兔早期椎间盘退变的初步研究[J].中国修复重建外科杂志,2012,26(8):977-983.
- [33] 王昕,陈小平,林金德,等.自体富血小板血浆-脂肪颗粒填充矫治唇部软组织缺损畸形的临床观察[J].中国美容整形外科杂志,2012,23(9):544-547.
- [34] 张宁,李放,罗涛.不同抗凝剂和激活剂组合在自体富血小板血浆凝胶支架促进脂肪干细胞增殖的影响[J].军医进修学院学报,2012,33(6):659-661,671.
- [35] 高悠水,朱珍宏,胡斌,等.低氧张力下骨髓间充质干细胞增殖与成骨分化特点及研究进展[J].国际骨科学杂志,2011,32(5):318-320.
- [36] 原工杰,刘琳,肖云鹤,等.孕酮对人牙周膜细胞增殖及成骨分化的调控作用[J].临床口腔医学杂志,2011,27(10):598-602.
- [37] 匡威,谭家莉,张红梅,等.miR146a参与炎症条件下骨髓间充质干细胞成骨分化的降低及其机制研究[J].临床口腔医学杂志,2011,27(11):643-645.
- [38] 王悦,杨旭芳,周延民,等.富血小板血浆对人脂肪间充质干细胞增殖及成骨分化能力的影响[J].口腔医学研究,2011,27(9):786-789.
- [39] 孙昊,王旭东,沈国芳,等.Dlx2在MC3T3-E1细胞成骨分化过程中的作用[J].中国口腔颌面外科杂志,2011,9(3):189-194.
- [40] 彭飞,郑亚东,徐西强,等.620nm低能量红光对骨髓间充质干细胞成骨分化的影响[J].激光生物学报,2011,20(3):285-288.
- [41] 赵丹,罗进勇.BMP9促进间充质干细胞C3H10T1/2成骨分化的研究[J].临床和实验医学杂志,2011,10(16):1225-1226,1230.