

骨关节炎患者膝关节滑膜组织来源间充质干细胞的增殖与分化

陈 路, 夏先学, 蒋 科(川北医学院附属医院骨科, 四川省南充市 637000)

文章亮点:

- 1 全膝关节置换是治疗晚期骨关节炎的有效手段, 在置换中切除需要的滑膜组织, 不会对关节正常结构和功能产生十分明显的影响。
- 2 晚期骨关节炎患者膝关节滑膜组织来源间充质干细胞体外分离培养后, 其具有高度的自我增殖能力, 倍增迅速, 生物性状稳定, 并有向成骨定向分化的潜能, 故滑膜间充质干细胞作为骨组织工程的种子细胞, 有望为骨缺损修复提供一种新的途径。

关键词:

干细胞; 骨髓干细胞; 骨关节炎; 间充质干细胞; 膝关节; 滑膜组织; 体外培养; 成骨细胞; 定向分化

主题词:

骨关节炎; 膝; 滑膜; 间质干细胞; 细胞增殖; 细胞分化; 组织工程

陈路, 男, 1976年生, 四川省南充市人, 汉族, 副教授, 主要从事骨关节疾病基础与临床研究。

中图分类号:R394.2

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2015)41-06561-05

稿件接受: 2015-08-20

http://www.cjter.org

摘要

背景: 相对于其他来源的间充质干细胞, 滑膜间充质干细胞来源丰富, 并且滑膜组织可以在部分切除后迅速再生, 并发症少, 已逐渐成为近年来干细胞研究的热点。

目的: 观察骨关节炎患者膝关节滑膜组织来源间充质干细胞的增殖和定向分化能力。

方法: 对滑膜组织来源间充质干细胞进行分离及培养, 采用 MTT 法检测细胞增殖能力, 于成骨诱导第 7 天定量检测碱性磷酸酶活性, 诱导第 7, 14, 21 天检测成骨相关基因表达, 诱导第 21 天行茜素红染色。

结果与结论: ①第 3 代滑膜间充质干细胞增殖速度较快, 接种第 1, 2 天处于潜伏期, 3-6 d 为对数增长期, 第 7 天细胞增殖速度变慢, 进入平台期。②成骨诱导后第 3, 7, 10 天诱导组碱性磷酸酶活性均显著高于对照组($P < 0.05$)。成骨诱导 21 d, 茜素红染色阳性, 细胞外基质中出现钙沉积以及钙结节。③成骨诱导第 7 天可见骨结合蛋白以及 Runx-2 的表达, 至第 21 天时, 骨结合蛋白以及 Runx-2 的表达水平达到最大值。④以上结果表明来源于晚期骨关节炎患者膝关节滑膜组织的间充质干细胞具有很强的增殖能力, 在体外可成功诱导分化为成骨细胞。

陈路, 夏先学, 蒋科. 骨关节炎患者膝关节滑膜组织来源间充质干细胞的增殖与分化[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(41):6561-6565.

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2015.41.001

Proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells from the synovial tissue in patients with osteoarthritis

Chen Lu, Xia Xian-xue, Jiang Ke (Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan Province, China)

Abstract

BACKGROUND: With respect to mesenchymal stem cells from other sources, synovial mesenchymal stem cells are rich in source, and moreover, the synovial tissue can regenerate quickly after partial hepatectomy and lead to fewer complications, in recent year, which have become a hot spot in stem cell research.

OBJECTIVE: To observe the proliferation and directional differentiation of synovial mesenchymal stem cells from osteoarthritis patients.

METHODS: Synovial mesenchymal stem cells were isolated and cultured. MTT assay was used to detect cell proliferation ability. Alkaline phosphatase activity was detected quantitatively at 7 days of osteogenic induction, and osteogenesis-related gene expression was measured at 7, 14, 21 days of osteogenic induction. Alizarin red staining was performed at 21 days of induction.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Passage 3 synovial mesenchymal stem cells proliferated faster, which were in latent period at 1, 2 days after inoculation, in logarithmic growth phase at 3-6 days, and then entered into the plateau phase at 7 days. (2) The activity of alkaline phosphatase was significantly higher in the induction group than the control group at 3, 7, 10 days after osteogenic induction ($P < 0.05$). The cells were positive for alizarin red staining at 21 days of osteogenic induction, and there were calcium deposits and calcium nodules in the extracellular matrix. (3) Bone-binding protein and Runx2 were visible at 7 days of osteogenic induction, and reached the peak at 21 days. These findings indicate that synovial mesenchymal stem cells from patients with advanced osteoarthritis have strong proliferation ability, which can differentiate into osteoblasts under *in vitro* induction.

Chen Lu, Associate professor, Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan Province, China

Accepted: 2015-08-20

Subject headings: Osteoarthritis, Knee; Synovial Membrane; Mesenchymal Stem Cells; Cell Proliferation; Cell Differentiation; Tissue Engineering

Chen L, Xia XX, Jiang K. Proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells from the synovial tissue in patients with osteoarthritis. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2015;19(41):6561-6565.

0 引言 Introduction

骨关节炎是一种常见的疾病, 临床对骨关节炎患者进行治疗大多采用常规药物保守治疗或手术治疗, 无法获得理想的效果^[1]。组织工程技术的发展为骨关节的治疗提供了新的方法和思路, 其中种子细胞是组织工程的核心研究内容^[2]。间充质干细胞是成体干细胞的一种, 具有高度自我更新能力和多向分化潜能, 在特定条件下可向成骨细胞、软骨细胞、骨骼肌细胞和脂肪细胞分化, 且来源广泛, 易于获取及扩增, 是骨骼肌肉系统组织工程理想的种子细胞。2001年, De Bari等^[3]从人滑膜组织中成功分离获取滑膜间充质干细胞, 并证明其具有多向分化潜能。也有研究从人膝关节滑膜组织中得到大量的间充质干细胞, 且具有增殖能力更强的优势^[4]。由于滑膜间充质干细胞来源丰富, 取材方便, 并且滑膜再生能力强, 并发症少, 已成为近年来成体干细胞研究的热点之一。值得注意的是, 滑膜和关节软骨由共同的间充质前体细胞发育而来, 因此滑膜间充质干细胞可能是关节软骨损伤修复理想的细胞来源。本实验分离获得晚期骨关节炎来源的滑膜间充质干细胞, 并对其进行体外成骨诱导分化, 探讨其作为骨组织工程种子细胞的可行性, 为临床研究和治疗等提供一定的参考依据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞体外观察性实验。

1.2 时间及地点 于2014年6月至2015年6月在川北医学院附属医院完成。

1.3 材料

滑膜间充质干细胞分离培养及成骨诱导分化实验所用主要试剂与仪器:

试剂与仪器	来源
高糖DMEM培养基、0.25%胰蛋白酶	美国Gibco公司
胎牛血清	美国Hyclone公司
茜素红、II型胶原酶	美国Sigma公司
DNA Ladder	北京全式金生物技术有限公司
β -甘油磷酸钠	上海酶联生物科技有限公司
维生素C、地塞米松	北京绿源大德生物科技有限公司
倒置相差显微镜	日本Olympus公司
CO ₂ 培养箱	德国Heraeus公司
紫外分光光度计	南京森贝伽生物科技有限公司
碱性磷酸酶检测试剂盒	南京建成生物研究所
Oligo(dT)、dNTP、DEPC水、PCR引物	上海奥陆生物科技有限公司

滑膜组织来源: 选取在川北医学院附属医院外科住院的膝关节骨性关节炎患者13例, 男5例, 女8例, 平均年龄68岁, 均行全膝关节置换治疗, 提取术中需切除的膝关节滑膜组织。术前向患者详细交代提取样本的用途及实验目的, 得到患者知情同意并签订知情同意书。排除有心血管疾病、肝肾疾病、肿瘤以及各种内分泌、结缔组织疾病患者。研究相关内容经川北医学院附属医院伦理部门审核并批准。

1.4 实验方法

1.4.1 滑膜组织来源间充质干细胞分离及培养 无菌取出膝关节滑膜组织, 放于含PBS的培养皿中去除脂肪和结缔组织, 用PBS清洗3遍, 剪成1 mm×1 mm×1 mm组织碎片, 加入0.25%胰酶于37 °C摇床中消化30 min, 加入0.1% II型胶原酶于37 °C摇床中消化2 h, 然后经100目筛网过滤去除组织碎片, 用移液管将过滤液移入离心管, 1 500 r/min离心10 min, 弃去上清液, 用含体积分数为10%胎牛血清的高糖DMEM培养基重悬, 于37 °C、体积分数为5% CO₂培养箱中培养, 隔天换液, 在倒置显微镜下观察细胞生长状况, 待细胞长满瓶底80%~90%时, 吸去培养液加入0.25%胰酶-0.02% EDTA消化, 镜下观察到胞质回缩, 细胞间质增大后, 加入体积分数10%胎牛血清的高糖DMEM培养基终止消化, 用吸管吹打成单细胞悬液, 以1:3进行传代培养并用于后续实验。

1.4.2 流式细胞仪检测滑膜组织来源间充质干细胞表面抗原表达 取第3代滑膜间充质干细胞, 弃去原培养基, PBS漂洗2次, 加入0.25%胰酶-0.02% EDTA消化, 用PBS洗涤2次后, 离心制成 $1 \times 10^{10} \text{ L}^{-1}$ 细胞悬液。取100 μL 细胞悬液加入实验管后分别加入3 μL 不同的荧光标记单克隆抗体(分别为CD34-FITC、CD44-PE、CD45-PE、CD90-FITC、CD14-FITC、CD71-FITC、CD105-PE)和相应的同型对照抗体振荡混匀, 室温避光孵育30 min后, 流式细胞仪检测, 使用CellQuest软件分析数据。

1.4.3 滑膜间充质干细胞生长增殖情况 取第3代滑膜间充质干细胞, 常规消化、离心后, 调整细胞悬液浓度为 $1 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$, 以每孔100 μL 接种于96孔板, 设5个复孔, 置于培养箱中培养24 h后每孔滴加5 μL MTT溶液(5 g/L), 再置于培养箱中培养4 h, 每孔滴加150 μL 二甲亚砜, 振荡10 min后用酶标仪测量每孔吸光度(A)值, 以时间为横坐标, 吸光度值为纵坐标绘制细胞生长曲线。

1.4.4 滑膜间充质干细胞成骨诱导分化能力 取第3代滑膜间充质干细胞, 胰酶消化传代, 接种于6孔板, 待细胞融合到80%后, 加入成骨细胞诱导液(含体积分数为10%胎牛

血清, 10^{-7} mol/L地塞米松, 10 mmol/L β -甘油磷酸钠, 0.2 mmol/L抗坏血酸的DMEM培养基)培养, 对照组只用含体积分数为10%胎牛血清的DMEM培养基培养, 每3 d换液1次, 诱导第7天进行碱性磷酸酶活性检测, 诱导第7, 14, 21天进行成骨相关基因表达检测, 诱导第21天进行茜素红染色。

1.4.5 碱性磷酸酶活性定量检测 在成骨诱导分化第3, 7, 10天, 吸弃培养液, PBS清洗3遍, 按碱性磷酸酶试剂盒操作步骤进行碱性磷酸酶活性检测, 用酶标仪测定波长570 nm处各孔吸光度值, 采用BCA法检测细胞内总的蛋白量, 用以校正碱性磷酸酶活性。

1.4.6 茜素红染色 取成骨诱导分化第21天的细胞, PBS清洗3次, 40 g/L多聚甲醛固定10 min, PBS清洗3次, 0.1%的茜素红室温染色40 min, PBS清洗3次, 倒置显微镜下观察染色结果。

1.4.7 RT-PCR检测成骨相关基因表达 取成骨诱导第7, 14, 21天细胞, 弃培养液, PBS冲洗3次后, 使用TRIzol试剂提取总RNA, 通过cDNA合成试剂盒将RNA反转录合成cDNA, 按反转录聚合酶链反应检测说明书操作步骤检测成骨相关基因表达。以 β -actin为内参照, 以目的基因与 β -actin mRNA比值表示目的基因表达量。实验所用的引物见表1。

表1 实验所用的引物

Table 1 Primers used in the experiment

基因	引物序列	片段长度
Runx-2	正链: 5'-GGA GTG GAC GAG GCA AGA GTT T-3'	140 bp
	反链: 5'-AGC TTC TGT CTG TGC CTT CTG G-3'	
骨结合蛋白	正链: 5'-CAT GCG AAT TGC AGT GAT TTG CT-3'	186 bp
	反链: 5'-CTT GGA AGG GTC TGT GGG G-3'	
β -actin	正链: 5'-CTG GGG CGC CCC AGG CAC CA-3'	540 bp
	反链: 5'-CTC CTT AAT GGC ACG CAC GTA TTC-3'	

1.5 主要观察指标 ①滑膜间充质干细胞生物学特性。②滑膜间充质干细胞成骨诱导后的碱性磷酸酶表达以及成骨诱导过程中成骨相关基因表达。

1.6 统计学分析 利用SPSS 19.0统计学软件进行数据处理, 计量资料予以 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 滑膜间充质干细胞形态 倒置显微镜下观察, 原代培养24 h左右大部分细胞贴壁, 细胞形态多样, 主要呈短小梭形, 还有一部分呈圆形、多边形、星形等。随着培养时间延长, 细胞密度变大。大约7 d可见细胞融合达培养瓶底面积的80%, 细胞呈梭形, 排列有序, 传代后细胞扩增速度明显加快, 细胞形态逐渐变成均匀一致的梭形, 呈平行排列或漩涡状排列(图1A, B)。

2.2 滑膜间充质干细胞表面抗原表达 利用流式细胞仪对滑膜间充质干细胞表面抗原进行检测, 其中CD105、

CD44、CD90 均呈阳性表达, 表达率均 $>99\%$, CD45、CD14、CD34、CD71均呈阴性表达, 表达率均在6%-8%之间。

2.3 滑膜间充质干细胞生长增殖情况 由第3代细胞生长曲线可见细胞增殖速度较快, 接种第1, 2天处于潜伏期, 3-6 d为对数增长期, 第7天细胞增殖速度变慢, 进入平台期, 说明滑膜间充质干细胞在体外具有很强的增殖能力(图2)。

2.4 滑膜间充质干细胞成骨诱导分化能力 第3代滑膜间充质干细胞经成骨诱导后, 细胞形态由梭形逐渐转变为立方形, 细胞逐渐发生汇合, 并形成铺路石状, 茜素红染色显示有钙沉积以及钙结节形成(图3)。

2.5 滑膜间充质干细胞成骨诱导后碱性磷酸酶表达水平 成骨诱导第3天碱性磷酸酶活性显著增加, 诱导第7天达到峰值, 随后逐渐降低。对照组细胞的碱性磷酸酶活性始终未出现明显的变化。诱导后第3, 7, 10天诱导组碱性磷酸酶活性均显著高于对照组($P < 0.05$), 见图4。

2.6 滑膜组织来源间充质干细胞成骨诱导过程中成骨相关基因表达 在成骨诱导第7天可见骨结合蛋白以及Runx-2的表达, 至第21天时, 骨结合蛋白以及Runx-2的表达水平均达到最大值, 见图5。

3 讨论 Discussion

骨关节炎是一种常见的慢性退行性疾病, 患者会出现不同程度的软骨退化现象^[5]。以往大多采用常规中药熏蒸、中药内服、针灸、推拿、离子导入等方式, 以提高局部血液循环, 改善软组织挛缩^[6-8], 并通过增加关节活动度, 阻止关节面的进一步损害来保持关节的正常功能, 多用于早期患者^[9]。对于关节软骨已经出现一定损伤, 且关节功能存在明显障碍者, 可以通过微创治疗并配合功能锻炼, 以促进关节功能的康复。对于晚期软骨损伤面积较大, 且开始出现关节畸形患者, 则推荐进行关节置换^[10]。不同的治疗方法均具有一定的局限性和不足之处, 无法获得满意的临床效果。

随着组织工程技术与干细胞技术的不断发展, 间充质干细胞与骨关节炎治疗相关问题逐渐引起人们的广泛关注^[11-13]。鉴于间充质干细胞具有多向分化潜能、能支持造血和促进造血干细胞植入、调节免疫以及分离培养操作简便等特点, 正日益受到人们的关注。在适宜的诱导条件下, 间充质干细胞能够较为容易地分化为软骨、成骨和脂肪细胞。目前, 根据间充质干细胞的生物学特性, 已建立骨髓、脂肪、脐血、脐带等多种组织来源间充质干细胞的分离、培养、扩增和鉴定的实验方法。滑膜组织具有很强的自我修复能力, 即便受到一定的手术创伤或化学损伤, 滑膜组织也能够完全恢复, 且不会对关节的正常结构和功能等产生十分明显的影响^[14-15]。为此, 实际临床治疗过程中, 以不损伤患者关节正常结构和功能为前提, 可以在微创手术

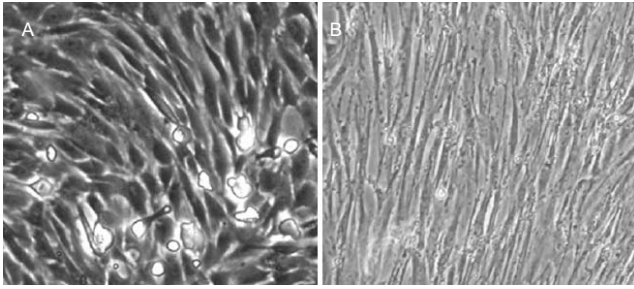


图1 滑膜间充质干细胞形态(×100)

Figure 1 Morphology of synovial mesenchymal stem cells (×100)

图注: 图中 A 为培养 24 h, 大部分细胞贴壁, 细胞形态多样, 主要呈短小梭形, 还有一部分呈圆形、多边形、星形等; B 为第 3 代滑膜间充质干细胞, 细胞形态逐渐变成均匀一致的梭形, 呈平行排列。

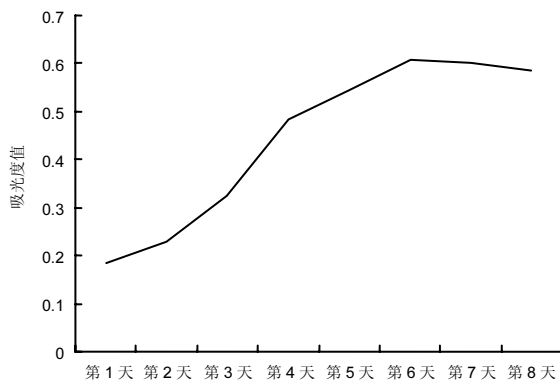


图2 第3代滑膜间充质干细胞生长曲线

Figure 2 Growth curve of passage 3 synovial mesenchymal stem cells

图注: 由第3代细胞生长曲线可见细胞增殖速度较快, 接种第1, 2天处于潜伏期, 3-6 d 为对数增长期, 第7天细胞增殖速度变慢, 进入平台期。

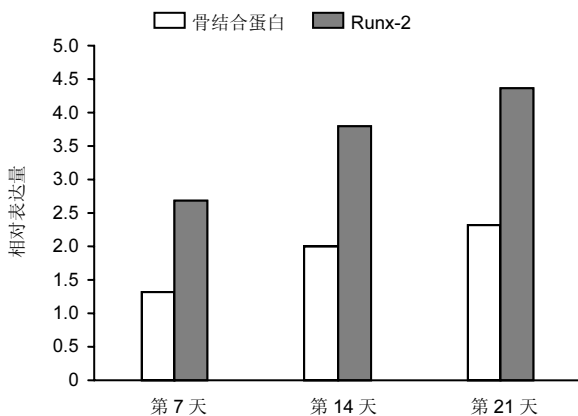


图5 滑膜间充质干细胞成骨诱导过程中成骨相关基因表达

Figure 5 Expression of osteogenesis-related markers in the synovial mesenchymal stem cells

过程中获得所需的滑膜组织。本研究纳入13例患者均接受全膝关节表面置换, 术中切除需要的滑膜组织, 从而分离获得丰富的组织工程种子细胞。而且, 受到滑膜自身特殊性的影响, 血管数量较少, 因此滑膜间充质干细胞免疫原性较低。

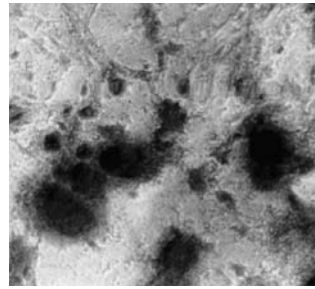


图3 滑膜间充质干细胞成骨诱导分化能力(×200)

Figure 3 Osteogenic and adipogenic induction of synovial mesenchymal stem cells (×200)

图注: 茜素红染色显示有钙沉积以及钙结节形成。

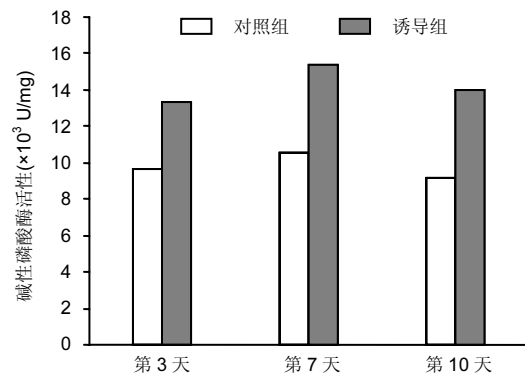


图4 滑膜间充质干细胞成骨诱导后碱性磷酸酶活性

Figure 4 Alkaline phosphatase activity of the synovial mesenchymal stem cells after osteogenic induction

图注: 诱导后第3, 7, 10天诱导组碱性磷酸酶活性均显著高于对照组($P < 0.05$)。

本实验获得的滑膜组织来源间充质干细胞具有典型的间充质干细胞生物学特性: 为成纤维细胞样, 呈漩涡状贴壁生长, 其中CD105、CD44、CD90 均呈阳性表达, 表达率均 $> 99\%$, CD45、CD14、CD34、CD71均呈阴性表达。由第3代滑膜间充质干细胞生长曲线可见细胞增殖速度较快, 接种第1, 2天处于潜伏期, 3-6 d 为对数增长期, 第7天细胞增殖速度变慢, 进入平台期, 说明滑膜间充质干细胞在体外具有很强的增殖能力。实验参照以往学者的方法对滑膜间充质干细胞进行成骨诱导分化^[16], 经定量碱性磷酸酶检测, 碱性磷酸酶表达水平呈现出不断上升的情况, 并在第7天达到最大值。在诱导21 d时, 经茜素红染色和观察, 可以发现存在大量被染成红色的钙质沉积。上述结果表明, 通过体外成骨诱导之后, 滑膜间充质干细胞成功的向骨细胞进行定向分化, 这一结果也提示, 诱导7 d为细胞外基质处于成熟期, 诱导21 d可能为矿化期。细胞诱导成骨分化过程涉及到一些标志物^[17], Runx2是一种成骨分化的特异性转录因子, 被认为是成骨过程中重要的标志物, 并对各种骨细胞外基质蛋白的合成产生积极的促进作用; 骨结合蛋白是成骨细胞特异转录因子, 在维持正常的骨骼生长发育中起着重

要作用^[18-20]。实验结果也发现,在成骨诱导第7天可见骨结合蛋白以及Runx-2的表达,至第21天时,骨结合蛋白以及Runx-2的表达水平达到最大值,这一结果也与上文提到的诱导7 d为细胞外基质处于成熟期,诱导21 d可能为矿化期的结果一致。但受到入组样本数量以及观察时间等因素的影响,研究所得到的相关结果以及结论可能存在一定的片面性和不准确。

综上所述,晚期骨关节炎患者膝关节滑膜组织来源间充质干细胞在一定的体外环境下可诱导分化为成骨细胞,表明滑膜组织来源间充质干细胞有可能成为重要的组织工程种子细胞来源之一,可以给未来的再生医学带来新希望,并在骨组织修复等过程中发挥出重要的作用。

作者贡献: 第一作者负责设计和实施,第二、三作者负责实施及文章的修改。

利益冲突: 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

伦理问题: 实验方案经川北医学院附属医院伦理委员会批准。试验方案已经患者及家属知情同意。

学术术语: Runx2 与骨相关疾病的关系? Runxx 相关因子是一类转录因子蛋白的统称,它们都是由 α 和 β 亚单位构成的异二聚体,其特点是在分子结构中均含有一个由 128 个氨基酸组成的 DNA 结合区,该结合区与果蝇属的分节基因 Runt 同源,因此被称为 Runt 结构域。Runxx 家族主要有 Runx1、Runx2 和 Runx3,其中 Runx2 又称为核心结合因子 $\alpha 1$ (core binding factor $\alpha 1$, Cbfa1), Runx2 基因位于人类常染色体的 6p21,长约 220 kb,包括 8 个外显子,并具有和其他家族成员相似的 Runt 结构域,是骨发育过程中调节间充质干细胞向成骨细胞分化和成熟最关键的转录因子,Runx2 的表达是成骨细胞开始分化的标志,因此它是骨形成过程中最早和最具特异性的标志基因,此基因的缺失将导致骨发育不良或终止。

作者声明: 文章第一作者对研究和撰写的论文中出现的不良行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁,可接受核查。

4 参考文献 References

- [1] 张平平,向川.骨髓间充质干细胞治疗骨关节炎:可能与未来[J].中国组织工程研究,2014,18(6):968-973.
- [2] 郑洁,王瑞辉,寇久社.炎症反应在骨关节炎软骨退变中的作用[J].基础医学与临床,2014,34(8):1146-1149.
- [3] De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, et al. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. Arthritis Rheum. 2001;44(8):1928-1942.
- [4] 芮云峰,林禹丞,陈辉,等.晚期骨关节炎患者膝关节滑膜间充质干细胞的体外成骨分化[J].中国组织工程研究,2013,17(45):7840-7846.
- [5] 杨勇,Tien Huey-y,陈山林,等.韧带重建肌腱团填塞术治疗第一腕掌关节骨关节炎的疗效分析[J].中华骨科杂志,2014,34(10):1030-1036.
- [6] 高文香,郝军.筋病理理论指导下中医综合疗法治疗膝骨关节炎[J].中医正骨,2014,26(1):60-62.
- [7] 孙奎,杨骏,沈德凯,等.隔附子饼灸治疗肝肾不足型膝原发性骨关节炎[J].中国针灸,2008,28(2):87-90.
- [8] 徐宁,刘蕊,臧嘉捷,等.草乌甲素片治疗骨关节炎效果和安全性评价[J].中国医药,2014,9(8):1170-1173.
- [9] 汪利合.玻璃酸钠关节腔注射与运动疗法治疗髌白发育不良性髌关节骨关节炎[J].中国组织工程研究与临床康复,2010,14(29):5403-5406.
- [10] 黎国权,覃海宁.关节置换治疗老年膝关节退行性骨关节炎的疗效[J].中国老年学杂志,2013,33(22):5543-5545.
- [11] 郭洪亮,帖小佳,韩亚军,等.定向诱导骨关节炎患者骨髓间充质干细胞向软骨细胞的分化[J].中国组织工程研究,2015,19(6):832-836.
- [12] 甘凤英,唐琛,郭迪斌,等.间充质干细胞移植治疗膝关节骨关节炎临床观察[J].现代诊断与治疗,2014,25(15):3512-3513.
- [13] 李治,赵伟,刘伟,等.玻璃酸钠及胎盘间充质干细胞和诱导的软骨细胞膝关节腔内注射:修复膝骨关节炎[J].中国组织工程研究,2014,18(50):8140-8146.
- [14] Campbell WG Jr, Callahan BC. Regeneration of synovium of rabbit knees after total chemical synovectomy by ingrowth of connective tissue-forming elements from adjacent bone. A light and electron microscopic study. Lab Invest. 1971;24(5):404-422.
- [15] Bentley G, Kreutner A, Ferguson AB. Synovial regeneration and articular cartilage changes after synovectomy in normal and steroid-treated rabbits. J Bone Joint Surg Br. 1975;57(4):454-462.
- [16] Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, et al. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. J Cell Physiol. 1990;143(3):420-430.
- [17] 徐凌霄,王芳,郭敦明,等.左归丸对间充质干细胞向软骨细胞分化过程中 II 型胶原及蛋白多糖基因表达的影响[J].中国中西医结合杂志,2011,31(12):1662-1668.
- [18] 李海东.血清性激素结合蛋白和 RANK/RANKL/OPG 系统在绝经后女性骨关节炎和骨质疏松中的作用研究[D].上海:上海交通大学,2011.
- [19] 牟方政,李荣亨,张文亮,等.复元胶囊对兔膝关节炎软骨中胰岛素样生长因子-I 及胰岛素样生长因子结合蛋白 3 表达的影响[J].中国老年学杂志,2011,31(12):2229-2231.
- [20] 王伟卓,程一钊,郭雄,等.大骨节病差异表达基因 PAPSS2 对成骨细胞矿化及碱性磷酸酶活性的影响[J].西安交通大学学报:医学版,2014,35(2):175-181.