

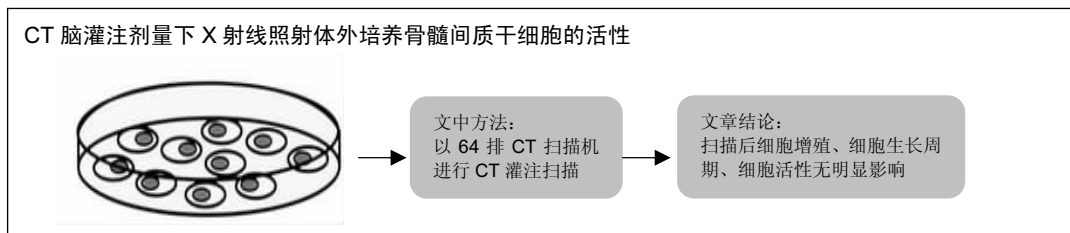
# 体外培养骨髓间充质干细胞的增殖活性：脑灌注剂量CT扫描评价

付风魁, 周海, 王军(滨州市人民医院放射科, 山东省滨州市 256610)

引用本文: 付风魁, 周海, 王军. 体外培养骨髓间充质干细胞的增殖活性: 脑灌注剂量 CT 扫描评价[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(14):2027-2032.

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2016.14.007 ORCID: 0000-0002-0113-2000(付风魁)

文章快速阅读:



付风魁, 男, 1964 年生, 山东省滨州市人, 副主任医师, 主要从事头颈部影像学方面的研究。

中图分类号: R394.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-4344

(2016)14-02027-06

稿件接受: 2016-02-18

<http://www.crter.org>

文题释义:

**CT 灌注扫描:** 是从静脉注射对比剂后对选定层面(1 层或多层)进行同层动态扫描, 以获得该层面内每 1 像素的时间-密度曲线, 根据该曲线利用数学模型计算脑血流量、脑血容量、对比剂平均通过时间、峰值时间和表面通透性等参数, 通过伪彩处理得到组织灌注功能图, 用来表现并评价组织器官灌注状态的功能成像方法。它反映的是组织或病灶内造影剂的灌注规律, 以及这些组织或病灶内的血流微循环规律。

**MTT 检测细胞增殖活性:** 活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性 MTT 还原为水不溶性的蓝紫色结晶甲瓚并沉积在细胞中, 而死细胞无此功能。二甲亚砜能溶解细胞中的甲瓚, 用酶标仪在 490 nm 波长处测定其吸光度值, 在一定细胞数范围内, MTT 结晶形成的量与细胞数成正比。根据测得的吸光度值来判断活细胞数量, 吸光度值越大, 细胞活性越强。

摘要

**背景:** 利用骨髓间充质干细胞移植治疗缺血性脑血管病是目前的研究热点, 移植后大多采用 CT 脑灌注扫描的方式了解缺血区血流改善情况, 但 CT 脑灌注 X 射线照射可能会影响所移植骨髓间充质干细胞的活性, 并影响到治疗效果。

**目的:** 探讨大鼠 CT 脑灌注扫描剂量对骨髓间充质干细胞活性的影响。

**方法:** 选取第 5 代 SD 大鼠骨髓间充质干细胞, 随机分为 3 组, 每组 6 管。从每组 6 管中随机选择 1 管不进行照射, 其余 5 管分别进行 1-5 次 CT 脑灌注扫描。扫描结束之后, 连续计数培养 10 d 的细胞数量, 描绘各管细胞生长曲线, 流式细胞仪检测各管细胞周期, MTT 法检测细胞活性。

**结果与结论:** 连续计数 10 d, 各管细胞数量经比较差异均无显著性意义( $P > 0.05$ )。各管细胞的生长曲线基本重合。各管细胞的不同细胞周期比例和细胞活性差异均无显著性意义( $P > 0.05$ )。实验结果表明, 常规进行 CT 脑灌注扫描对骨髓间充质干细胞活性无影响。

关键词:

干细胞; 骨髓干细胞; 骨髓间充质干细胞; CT 脑灌注; X 射线; 细胞活性

主题词:

骨髓; 间充质干细胞; 灌注成像; 体层摄影术; 螺旋计算机; 组织工程

## Proliferative activity of bone marrow mesenchymal stem cells cultured *in vitro*: assessment by a CT brain perfusion scan

Fu Feng-kui, Zhou Hai, Wang Jun (Department of Radiology, Binzhou People's Hospital, Binzhou 256610, Shandong Province, China)

Abstract

**BACKGROUND:** Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation is a hot spot in the treatment of ischemic cerebrovascular diseases, and CT brain perfusion scan is mostly used to observe the

Fu Feng-kui, Associate  
chief physician,  
Department of Radiology,  
Binzhou People's Hospital,  
Binzhou 256610,  
Shandong Province, China

improvement in the blood flow in the ischemic region. However, X-ray irradiation during CT brain perfusion may affect the viability of transplanted bone marrow mesenchymal stem cells, and then influence the therapeutic efficacy.

**OBJECTIVE:** To investigate the effect of CT brain perfusion dose on the viability of bone marrow mesenchymal stem cells.

**METHODS:** Passage 5 bone marrow mesenchymal stem cells from Sprague-Dawley rats were selected and randomized into three groups, with 6 tubes in each group. One of the six tubes in each group was randomly selected with no irradiation, and the remaining five tubes in each group were subjected to CT brain perfusion scans 1–5 times, respectively. After scanning, the cell number was counted after 10-day continuous culture and cell growth curve of each tube was drawn. Cell cycle was detected by flow cytometry, and cell viability was measured by MTT method.

**RESULTS AND CONCLUSION:** After 10 days of continuous counting, the number of cells per tube showed no difference ( $P > 0.05$ ), and cell growth curves were basically coincided. Moreover, there was no significant difference in the cell cycle and cell viability ( $P > 0.05$ ). Experimental findings show that the CT brain perfusion scan has no effect on the viability of bone marrow mesenchymal stem cells.

**Subject headings:** Bone Marrow; Mesenchymal Stem Cells; Perfusion Imaging; Tomography, Spiral Computed; Tissue Engineering.

**Cite this article:** Fu FK, Zhou H, Wang J. Proliferative activity of bone marrow mesenchymal stem cells cultured in vitro: assessment by a CT brain perfusion scan. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2016;20(14):2027-2032.

## 0 引言 Introduction

干细胞移植为临床神经系统疾病治疗尤其是其功能恢复带来了新的希望<sup>[1]</sup>。骨髓间充质干细胞具有多向分化潜能,除了具有向成骨、软骨和脂肪细胞分化潜能外,还有向肝细胞、神经细胞、心肌细胞、血管内皮细胞和胰岛细胞等多向分化的潜能<sup>[2]</sup>,且不存在传播疾病的风险,还能应用自身干细胞移植,避免产生免疫排斥反应。脑CT灌注成像检查可了解大脑生理功能及能量代谢情况,由普通CT增强扫描发展而来,保留了CT检查微创、快速的优点,对于骨髓间充质干细胞治疗效果评估具有重要意义。CT检查有较高的X射线辐射剂量,接受过量射线可引起细胞不可逆的损害及染色体畸变,影响受照个体及其后代<sup>[3-5]</sup>。以往对放射线照射后细胞活性的研究大多是活体条件下进行,研究内容主要为免疫细胞以及各种肿瘤细胞,关于体外研究的报道较少。为此,实验选择CT脑灌注剂量照射体外培养骨髓间充质干细胞,了解放射线照射对干细胞活性的影响。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外细胞学观察实验。

1.2 时间及地点 实验于2015年6至8月在滨州市人民医院完成。

1.3 材料

1.3.1 实验细胞 SD大鼠骨髓间充质干细胞由上海拜力生物科技有限公司提供,经流式细胞仪检测细胞表面

标志物CD29与CD44呈阳性表达,CD45呈阴性表达。

1.3.2 实验试剂及仪器 胰蛋白酶(美国Amresco公司),乙醇(东光鑫源化工有限公司),锥虫蓝(北京索莱宝科技有限公司),MTT溶液(上海微蒙生物技术有限公司),二甲基亚砷(广州速聚生物科技有限公司),GE Light Speed64排CT扫描机(美国通用电器公司),Ependoff管(上海雅心生物技术有限公司),流式细胞仪(上海信裕生物科技有限公司),CO<sub>2</sub>培养箱(上海恒远生物科技有限公司),酶联免疫检测仪(北京裕恒丰科技有限公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 实验分组与CT灌注扫描 选取第5代骨髓间充质干细胞,加入胰蛋白酶进行消化,细胞计数后,调整细胞浓度为 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 。将细胞接种在18个Ependoff管(1.5 mL)中,每管1 mL,随机分为3组,每组6管。从每组中随机选择1管不进行射线照射,其余5管分别行1–5次CT脑灌注扫描,按预先设定的大鼠脑灌注方式进行扫描,扫描参数:管电压80 kV,管电流100 mA,矩阵 $512 \times 512$ ,扫描范围40 mm/s,采集16幅图像,连续扫描40 s,共采集640幅图像,间隔2 min扫描1次,扫描在30 min内完成<sup>[6]</sup>。

1.4.2 细胞生长曲线的绘制 扫描结束之后,取上述一组6管细胞分别接种于48孔培养板,每孔细胞数量为 $2.5 \times 10^4$ 个。连续10 d每天在同一时间取4孔细胞,添加胰蛋白酶消化,并进行细胞计数<sup>[7]</sup>,以每孔细胞数量为纵坐标,培养时间为横坐标,描绘各管细胞生长曲线。

表 1 不同脑灌注剂量照射下细胞计数统计

 $(\bar{x} \pm s, n=8, \times 10^3 \text{ 个})$ 

Table 1 Statistical analysis of cell count under irradiation with different cerebral perfusion doses

组别	对照组	1 次照射	2 次照射	3 次照射	4 次照射	5 次照射
1 d	2.05±0.02	2.06±0.01	2.05±0.01	2.06±0.02	2.06±0.02	2.05±0.01
2 d	2.21±0.03	2.22±0.03	2.22±0.02	2.21±0.03	2.23±0.02	2.21±0.03
3 d	3.65±0.04	3.64±0.03	3.64±0.04	3.65±0.04	3.66±0.03	3.65±0.04
4 d	4.87±0.05	4.86±0.06	4.87±0.05	4.68±0.06	4.88±0.04	4.86±0.05
5 d	10.58±0.07	10.57±0.06	10.58±0.06	10.57±0.06	10.58±0.07	10.58±0.06
6 d	12.05±0.09	12.01±0.09	12.04±0.09	12.03±0.08	12.05±0.08	12.04±0.08
7 d	11.02±0.11	11.03±0.10	11.02±0.10	11.02±0.11	11.03±0.12	11.02±0.11
8 d	10.89±0.08	10.88±0.09	10.88±0.08	10.89±0.09	10.87±0.08	10.88±0.09
9 d	10.61±0.07	10.60±0.08	10.61±0.07	10.60±0.08	10.62±0.06	10.61±0.07
10 d	10.15±0.06	10.16±0.05	10.14±0.06	10.16±0.05	10.15±0.06	10.14±0.05

1.4.3 流式细胞仪检测细胞生长周期 取一组6管细胞在照射结束之后进行离心, 去掉多余的培养液, 添加冰冻乙醇制备混合物, 置于4 °C冰箱48 h, 利用流式细胞仪检测各管细胞周期<sup>[8]</sup>。

1.4.4 MTT法检测细胞活性 取一组6管细胞混合物进行射线照射, 每管取3滴经锥虫蓝染色, 计算细胞活力。将细胞接种于96孔培养板, 每孔细胞数量为 $2 \times 10^4$ 个, 每管5孔, 置37 °C, 体积分数为5%CO<sub>2</sub>培养箱中孵育24 h, 添加20 μL MTT溶液, 继续孵育4 h, 吸弃孔内培养液, 添加二甲基亚砷150 μL, 振荡10 min, 利用酶联免疫检测仪检测各孔在490 nm波长处的吸光度值, 以150 μL二甲基亚砷为空白对照组<sup>[9]</sup>。

1.5 主要观察指标 不同脑灌注剂量照射下细胞生长计数、细胞生长周期、细胞活性。

1.6 统计学分析 采用SPSS 19.0软件完成数据处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 并进行方差齐性检验,  $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

2.1 不同脑灌注剂量照射下细胞生长计数和生长曲线 将接受不同处理的各管细胞接种在培养板上进行培养, 每天进行细胞计数, 连续计数10 d, 获得不同时间的细胞数量。各管不同时间的细胞数量差异无显著性意义( $P > 0.05$ ), 见表1。经观察发现, 各管的细胞生长曲线基本重合, 见图1。

2.2 各管照射细胞生长周期 各组数据呈正态分布, 各管细胞周期比例差异均无显著性意义( $P > 0.05$ ), 具体结果见表2, 图2。

2.3 细胞活性 经锥虫蓝染色显示各管细胞活力平均数均大于95%。未照射组与各照射组各管细胞活性差异

无显著性意义( $P > 0.05$ ), 结果见表3, 图3。

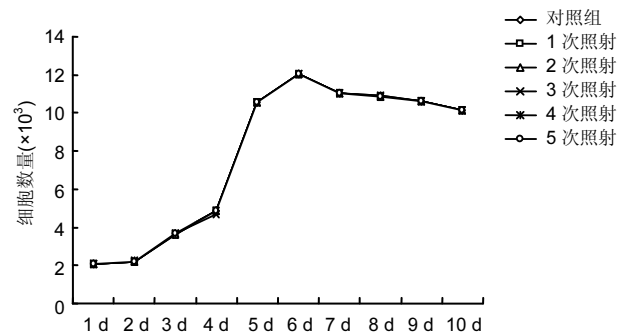


图 1 不同脑灌注剂量照射下细胞生长曲线

Figure 1 Cell growth curves under irradiation with different cerebral perfusion doses

表 2 各管照射细胞的生长周期

 $(\bar{x} \pm s, \%)$ 

Table 2 Detection of cell cycle by flow cytometry

组别	细胞周期		
	G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> +M
对照组	86.35±1.45	3.95±0.45	8.85±0.75
1 次照射	85.37±1.49	4.85±0.21	9.01±0.89
2 次照射	86.12±2.10	4.45±0.28	9.02±0.88
3 次照射	85.36±1.58	3.98±0.58	8.99±0.85
4 次照射	86.12±1.39	4.65±0.35	9.02±0.65
5 次照射	85.65±1.45	4.85±0.45	9.03±0.68

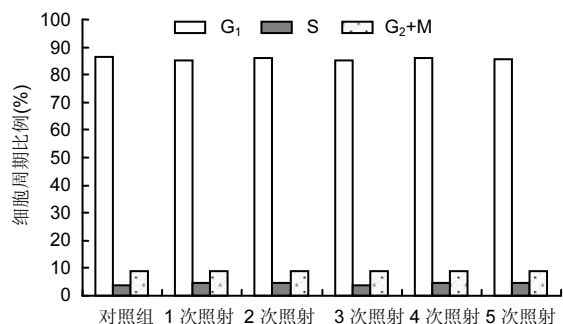


图 2 各管照射细胞的生长周期

Figure 2 Cell cycle detected by flow cytometry

表 3 MTT 法检测各管细胞吸光度值 ( $\bar{x} \pm s, n=16$ )  
Table 3 Absorbance value of cells per tube detected using MTT method

组别	吸光度
对照组	0.465 3±0.001 4
1 次照射	0.467 1±0.001 4
2 次照射	0.468 2±0.001 1
3 次照射	0.470 1±0.001 2
4 次照射	0.463 5±0.001 3
5 次照射	0.471 0±0.001 4

### 3 讨论 Discussion

神经系统疾病具有发病率高、患病率高、致残率高等特点。临床上采用常规治疗大多无法获得理想的效果<sup>[10-14]</sup>。为此, 积极寻找有效促进脑组织修复以及功能重建的治疗方法, 成为临床治疗的重点内容<sup>[15]</sup>。随着干细胞理论及相关技术的不断发展, 干细胞开始被积极的应用于各种神经系统疾病的治疗<sup>[16-20]</sup>。骨髓间充质干细胞具有很强的自我更新和多向分化能力<sup>[21]</sup>, 且取材方便, 移植后不良反应较为轻微, 是一种理想的干细胞类型<sup>[22-25]</sup>。

随着科学技术的迅猛发展, CT 已成为医疗机构诊断治疗疾病不可或缺的辅助手段, 其出现将医学影像检查带入了一个新的划时代阶段, CT 的不断升级换代显著提高了疾病诊断效果。CT 灌注成像作为一种显示器官功能的影像技术, 由普通 CT 增强扫描发展而来, 保留了 CT 检查微创、快速的优点, 其在静脉注射对比剂的同时对选定的脑层面进行连续多次同层扫描, 可以对脑组织的血流动力学变化进行定量或半定量分析<sup>[26-27]</sup>。CT 灌注成像技术不但可以显示器官组织的形态图像, 还能显示器官组织的功能图像, 可以评价脑组织缺血程度和实际范围等, 对于骨髓间充质干细胞治疗效果评估具有重要意义<sup>[28]</sup>, 然而随着 CT 的不断普及, 显著增加了放射剂量。在扫描过程中, CT 脑灌注 X 射线照射可能会对所移植骨髓间充质干细胞的活性产生影响。

细胞周期指的是细胞从前一次分裂结束起到下一次分裂结束整个阶段所经历的过程<sup>[29]</sup>。细胞周期可以分为细胞间期以及细胞分裂期(M 期), 细胞间期又可以划分为 3 个不同的阶段, 包括 G<sub>1</sub> 期——DNA 合成前期, S 期——DNA 合成期, G<sub>2</sub> 期——DNA 合成后期<sup>[30]</sup>。从放射生物学理论角度进行分析, 在接受一定剂量辐射之

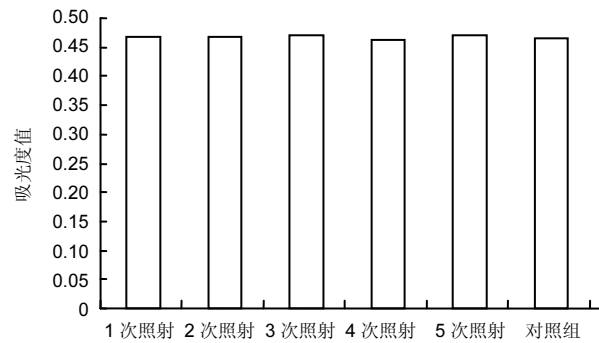


图 3 MTT 法检测各管细胞吸光度值

Figure 3 Absorbance value of cells per tube detected using MTT method

后, 细胞会受到不同程度的损伤<sup>[31]</sup>, 其中 M 期细胞最敏感, G<sub>2</sub> 期细胞对射线的敏感性与 M 期细胞较为接近, S 期细胞对射线的敏感性最差<sup>[32]</sup>。研究结果显示, 各管照射细胞生长周期呈正态分布, 各管细胞的不同细胞周期比例差异均无显著性意义( $P > 0.05$ ), 表明经一定的脑灌注 CT 扫描剂量, 骨髓间充质干细胞的分裂期不会受到显著影响, 此条件下细胞所受到的直接损伤作用较小。研究结果还显示, 将接受不同处理的各管细胞连续培养 10 d, 细胞数量经比较差异均无显著性意义( $P > 0.05$ )。各管的细胞生长曲线基本重合。经锥虫蓝染色, 各管细胞活力平均数均大于 95%。未照射组与各照射组细胞活性比较差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。上述结果提示, 各管细胞生长速度基本保持一致, 不同脑灌注剂量照射作用下, 细胞生长均未受到较大的影响。以往对放射线照射后细胞活性的研究大多是体内条件下进行, 研究内容主要为免疫细胞以及各种肿瘤细胞, 关于体外细胞的研究相对较少<sup>[33-37]</sup>。另外, 在对射线照射与细胞活性相关问题进行研究过程中, 大多使用 X 射线治疗机<sup>[38-40]</sup>。该实验选择使用 CT 机进行照射, 研究不同照射剂量下的细胞活性, 以了解 CT 扫描监测是否会对干细胞移植效果产生影响。研究结果表明, 常规照射剂量不会对骨髓间质干细胞的活性产生影响。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相应的结论可能存在一定的片面性和不准确。另外, 该实验仅在体外环境下对脑灌注扫描下骨髓间充质干细胞的有关生物学特性进行分析。体外观察性实验与临床体内实际情况存在一定差异, 因此, 还需要在今后的研究中予以进一步完善和分析, 以期为临床治疗等提供更多可靠的参考依据。

作者贡献: 实验设计、实施、评估为全部作者。

**利益冲突:** 所有作者共同认可文章内容不涉及相关利益冲突。

**伦理问题:** 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。

**文章查重:** 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

**文章外审:** 本刊实行双盲外审制度, 文章经国内小同行外审专家审核, 符合本刊发稿宗旨。

**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。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

#### 4 参考文献 References

- [1] 王文益, 赵聪敏. EPO 基因修饰 MSCs 对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤的治疗作用[J]. 重庆医学, 2009, 38(22): 2787-2789.
- [2] 赖文玉, 刘畅, 吴燕云, 等. 人骨髓间充质干细胞移植对缺氧缺血性脑病新生大鼠学习记忆功能的影响[J]. 中华生物医学工程杂志, 2008, 14(1): 27-30.
- [3] Kim MK, Cho KJ, Park SI, et al. Initial stage affects survival even after complete pathologic remission is achieved in locally advanced esophageal cancer: analysis of 70 patients with pathologic major response after preoperative chemoradiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2009; 75(1): 115-121.
- [4] Wang F, Zhang YC, Zhou H, et al. Evaluation of in vitro and in vivo osteogenic differentiation of nano-hydroxyapatite/chitosan/poly(lactide-co-glycolide) scaffolds with human umbilical cord mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res A.* 2014; 102(3): 760-768.
- [5] Cho H, Choi YK, Lee DH, et al. Effects of magnetic nanoparticle-incorporated human bone marrow-derived mesenchymal stem cells exposed to pulsed electromagnetic fields on injured rat spinal cord. *Biotechnol Appl Biochem.* 2013; 60(6): 596-602.
- [6] Ghaffari M, Moztarzadeh F, Sepahvandi A, et al. How bone marrow-derived human mesenchymal stem cells respond to poorly crystalline apatite coated orthopedic and dental titanium implants. *Ceramics International.* 2013; 39(7): 7793-7802.
- [7] Zhou L, Kong JT, Zhuang YP, et al. Ex vivo expansion of bone marrow mesenchymal stem cells using microcarrier beads in a stirred bioreactor. *Biotechnology & Bioprocess Engineering.* 2013; 18(1): 173-184.
- [8] 朱美玲, 李艳, 彭爱军, 等. 人胚胎骨髓间质干细胞移植治疗新生大鼠缺氧缺血性脑病的实验[J]. 中国临床康复, 2005, 9(46): 6-8.
- [9] 李禄全, 余加林. 鼠骨髓间充质干细胞在缺氧缺血性脑病新生鼠脑内的分布及分化[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(4): 327-330.
- [10] Kroustalli AA, Kourkouli SN, Deligianni DD. Cellular Function and Adhesion Mechanisms of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells on Multi-walled Carbon Nanotubes *Annals of Biomedical Engineering.* 2013; 41(12): 2655-2665.
- [11] Cho H, Seo YK, Yoon HH, et al. Neural stimulation on human bone marrow-derived mesenchymal stem cells by extremely low frequency electromagnetic fields. *Biotechnol Prog.* 2012; 28(5): 1329-1335.
- [12] Zhong Y, Xu J, Deng M, et al. Generation of a human bone marrow-derived mesenchymal stem cell line expressing and secreting high levels of bioactive  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone. *J Biochem.* 2013; 153(4): 371-379.
- [13] Wang X, He D, Chen L, et al. Cell-surface ultrastructural changes during the in vitro neuron-like differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Scanning.* 2011; 33(2): 69-77.
- [14] Ling SK, Wang R, Dai ZQ, et al. Pretreatment of rat bone marrow mesenchymal stem cells with a combination of hypergravity and 5-azacytidine enhances therapeutic efficacy for myocardial infarction. *Biotechnol Prog.* 2011; 27(2): 473-482.
- [15] Tzameret A, Sher I, Belkin M, et al. Transplantation of human bone marrow mesenchymal stem cells as a thin subretinal layer ameliorates retinal degeneration in a rat model of retinal dystrophy. *Exp Eye Res.* 2014; 118: 135-144.
- [16] 谢帆. 骨髓间充质干细胞治疗缺血性脑卒中的研究与应用[J]. 西南军医, 2014, 16(2): 203-206.
- [17] 王戈鹰, 窦玲, 吴爽, 等. 构建稳定表达胞外信号调节激酶的大鼠骨髓间充质干细胞及其对大鼠脑卒中的神经保护作用[J]. 解剖学杂志, 2013, 36(3): 345-349.
- [18] Xue F, Wu EJ, Zhang PX, et al. Biodegradable chitin conduit tubulation combined with bone marrow mesenchymal stem cell transplantation for treatment of spinal cord injury by reducing glial scar and cavity formation. *Neural Regen Res.* 2015; 10(1): 104-111.
- [19] Enomoto M. The future of bone marrow stromal cell transplantation for the treatment of spinal cord injury. *Neural Regen Res.* 2015; 10(3): 383-384.
- [20] 韩聪. 骨髓间充质干细胞治疗缺血性脑卒中的研究进展[J]. 中国临床神经外科杂志, 2011, 16(11): 697-700.

- [21] Kim SH, Oh SA, Lee WK. Poly(lactic acid) porous scaffold with calcium phosphate mineralized surface and bone marrow mesenchymal stem cell growth and differentiation. *Materials Science & Engineering C*. 2011; 31(3):612-619.
- [22] Chong PP, Selvaratnam L, Abbas AA, et al. Human peripheral blood derived mesenchymal stem cells demonstrate similar characteristics and chondrogenic differentiation potential to bone marrow derived mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 2012;30(4): 634-642.
- [23] Krishnamurthy G, Murali MR, Hamdi M, et al. Characterization of bovine-derived porous hydroxyapatite scaffold and its potential to support osteogenic differentiation of human bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Ceramics International*. 2014; 40(1):771-777.
- [24] 韩聪.骨髓间充质干细胞治疗缺血性脑卒中的机制研究[J].立体定向和功能性神经外科杂志,2011,24(2): 125-128.
- [25] 裴远,靳令经,聂志余.不同类型干细胞移植治疗缺血性脑卒中的研究现状[J].上海医学,2012,35(1):84-87.
- [26] Bhang SH, Gwak SJ, Lee TJ, et al. Cyclic mechanical strain promotes transforming-growth-factor-beta1-mediated cardiomyogenic marker expression in bone-marrow-derived mesenchymal stem cells in vitro. *Biotechnol Appl Biochem*. 2010;55(4):191-197.
- [27] 张世魁,马娅琼,杨蓉佳,等.128层螺旋CT灌注成像在诊断急性脑梗死及评价患者临床预后的应用价值[J].中国动脉硬化杂志,2015,23(6):603-606.
- [28] 王长河.CT脑灌注成像与CT血管成像对颈动脉狭窄性短暂性脑缺血发作的诊断价值[J].中国实用神经疾病杂志, 2015,18(7):69-71.
- [29] 刘俊中,王天玉,郭广涛,等.急性缺血性脑卒中应用CT脑灌注与血管造影诊断价值研究[J].中国CT和MRI杂志, 2015,13(7):4-6.
- [30] 张玉伟,田辉强,李青伟,等.低辐射剂量 CT脑灌注成像与CT平扫在急性脑梗死诊断中的应用效果比较[J].临床合理用药杂志,2015,8(19):116-117.
- [31] 张玉伟,田辉强,李青伟,等.低辐射剂量CT脑灌注成像在急性脑梗死治疗中的应用[J].临床合理用药杂志,2015, 8(13):78-79.
- [32] Marycz K, Śmieszek A, Grzesiak J, et al. Application of bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells for testing the biocompatibility of metal-based biomaterials functionalized with ascorbic acid. *Biomed Mater*. 2013;8(6):065004.
- [33] 王万宏,王亚林,卢庆韬.自体骨髓间充质干细胞移植对脑出血患者神经功能及血浆Hcy的影响[J].中国实验诊断学,2015,19(8):1324-1325.
- [34] 何展文,刘木金,孟哲,等.异体骨髓间充质干细胞对 EAE大鼠神经再生保护作用的研究[J].中国实用神经疾病杂志,2015,18(14):1-4.
- [35] Ye X, Yin X, Yang D, et al. Ectopic bone regeneration by human bone marrow mononucleated cells, undifferentiated and osteogenically differentiated bone marrow mesenchymal stem cells in beta-tricalcium phosphate scaffolds. *Tissue Eng Part C Methods*. 2012;18(7):545-556.
- [36] Gershovitch PM, Gershovitch JG, Zhambalova AP, et al. Cytoskeletal proteins and stem cell markers gene expression in human bone marrow mesenchymal stromal cells after different periods of simulated microgravity. *Acta Astronautica*.2012;70(1):36-42.
- [37] 刘超,吴海琴,严璞,等.骨髓间充质干细胞移植治疗缺血性脑卒中疗效和安全性的Meta分析[J].中国循证医学杂志, 2015,15(6):659-663.
- [38] Barry F, Boynton RE, Liu B, et al. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components. *Exp Cell Res*. 2001;268(2): 189-200.
- [39] 余倩.骨髓间充质干细胞移植治疗缺血性脑卒中的机制[J].检验医学与临床,2014,11(3):407-408.
- [40] 王苏平,孙鑫,李深.骨髓间充质干细胞治疗缺血性脑卒中研究进展[J].中风与神经疾病杂志,2014,31(3):280-282.