

关节腔内骨髓间充质干细胞与同种异体骨的共培养

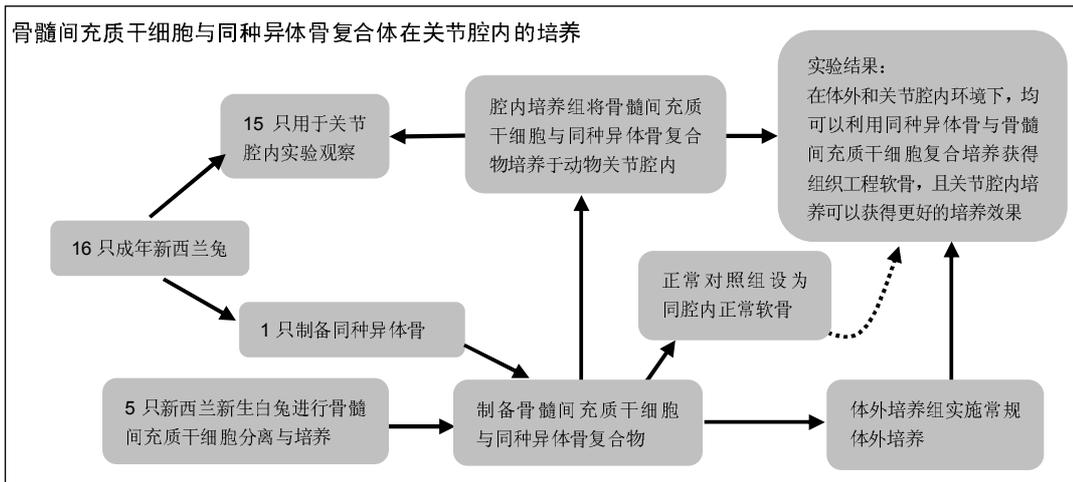
高峰光¹, 周百岁¹, 牟海波²(滨州医学院烟台附属医院, ¹骨关节科, ²创伤科, 山东省烟台市 264100)

引用本文: 高峰光, 周百岁, 牟海波. 关节腔内骨髓间充质干细胞与同种异体骨的共培养[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(19): 2756-2762.

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2016.19.003

ORCID: 0000-0001-6799-7931(高峰光)

文章快速阅读:



高峰光,男,1964年生,内蒙古自治区人,副主任医师,主要从事骨关节软骨方面的研究。

通讯作者:牟海波,滨州医学院烟台附属医院创伤科,山东省烟台市 264100

中图分类号:R394.2

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2016)19-02756-07

稿件接受:2016-03-02

http://www.crter.org

文题释义:

局部微环境:在将构建的组织工程软骨植入局部进行修复治疗的过程中,会受到局部微环境的较大影响。局部的实际理化环境与各种生长因子,以及力学刺激等均会对组织工程软骨产生极大的影响,并直接影响到软骨修复效果。为此,在进行组织工程软骨构建的时候,可以尝试通过一定的方式,利用各种理化因子和局部血运等因素以更快的速度获得质量更好的组织工程软骨。

同种异体骨:经去抗原免疫、深低温冷冻等处理,抗原性极低,且具有良好的孔隙结构和生物相容性,可以为种子细胞的生长提供所需的空间,是一种十分理想的支架材料。

摘要

背景:构建组织工程软骨的时候,同种异体骨与骨髓间充质干细胞是常用的支架材料和种子细胞,以往大多采用体外培养的方式。膝关节内游离体可以长期存在于关节腔中,并维持一定的软骨组织学特性。因此,关节腔可能为软骨细胞的生长和发育提供良好的环境条件。

目的:探讨在关节腔内骨髓间充质干细胞与同种异体骨复合培养的效果。

方法:纳入5只新西兰新生白兔进行骨髓间充质干细胞分离与培养,利用1只成年新西兰白兔制备同种异体骨,进行骨髓间充质干细胞与同种异体骨复合。实验分组:腔内培养组将骨髓间充质干细胞与同种异体骨复合培养于动物关节腔内,正常对照组设为同腔内正常软骨,体外培养组实施常规体外培养。培养4,8,12周进行组织学苏木精-伊红染色观察及II型胶原免疫组织化学染色观察。

结果与结论:①培养12周进行苏木精-伊红染色和观察,正常对照组细胞质和软骨基质出现红染,细胞核出现蓝染,软骨细胞按照一定的方向呈紧密状有序排列。腔内培养组细胞质和软骨基质出现红染,细胞核出现蓝染,支架材料基本吸收。软骨细胞长入支架之中,细胞按照一定应力方向排列,且形态变小。体外培养组软骨细胞出现大量增殖,但呈无序状排列;②经免疫组织化学染色和观察,计数可得,随着培养时间的推移,腔内培养组的A值呈现出不断上升的情况,体外培养组和正常对照组均未出现明显的改变。且培养4,8,12周,正常对照组和腔内培养组的A值均显著高于体外培养组($P < 0.05$)。培养4,8周,腔内培养组的A值均显著低于正常对照组($P < 0.05$)。但培养12周,腔内培养组与正常对照组A值差异无显著性意义($P > 0.05$);③实验结果表明,在体外和关节腔内环境下,均可以利用同种异体骨与骨髓间充质干细胞复合培养获得组织工程软骨,且关节腔内培养可以获得更好的培养效果。

Gao Feng-guang,
Associate chief physician,
Department of Orthopedics
and Joints, Affiliated Yantai
Hospital of Binzhou
Medical University, Yantai
264100, Shandong
Province, China

Corresponding author: Mu
Hai-bo, Department of
Traumatology, Affiliated
Yantai Hospital of Binzhou
Medical University, Yantai
264100, Shandong
Province, China

关键词:

干细胞; 骨髓干细胞; 关节腔; 软骨; 软骨生物材料; 骨髓间充质干细胞; 同种异体骨; 组织工程软骨; 共培养

主题词:

干细胞; 间质干细胞; 软骨; 细胞培养技术; 组织工程

Bone marrow mesenchymal stem cells co-cultured with allogenic bone in the articular cavity

Gao Feng-guang¹, Zhou Bai-sui¹, Mu Hai-bo² (¹Department of Orthopedics and Joints, ²Department of Traumatology, Affiliated Yantai Hospital of Binzhou Medical University, Yantai 264100, Shandong Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Bone marrow mesenchymal stem cells and allogenic bones are commonly used as seed cells and scaffolds, respectively, for constructing tissue-engineered cartilage through *in vitro* co-culture. The loose body of the knee joint can survive in the articular cavity for a long time, and maintain certain characteristics of cartilage tissues. Therefore, the articular cavity can provide a good environment for the growth and development of chondrocytes.

OBJECTIVE: To investigate the effect of bone marrow mesenchymal stem cells co-cultured with allogenic bone in the articular cavity.

METHODS: Bone marrow mesenchymal stem cells were isolated from five newborn New Zealand white rabbits. One adult New Zealand rabbit was enrolled to prepare allogenic bone for co-culture with bone marrow mesenchymal stem cells. Afterwards, bone marrow mesenchymal stem cells and allogenic bone composites were cultured in the articular cavity (intracavitary culture group) or *in vitro* as *in vitro* culture group, respectively; the normal cartilage tissues grew in the articular cavity as control group. Cells were observed by hematoxylin-eosin staining and type II collagen immunohistochemistry staining at 4, 8 and 12 weeks of culture.

RESULTS AND CONCLUSION: At 12 weeks culture, hematoxylin-eosin staining showed: in the control group, chondrocytes arranged tightly and directionally with red stained cytoplasm and cartilage matrix as well as blue nuclei; in the intracavitary culture group, the scaffold was mostly absorbed and chondrocytes grew into the scaffold in a certain direction with smaller shape, while cytoplasm and cartilage matrix were red stained, blue nuclei appeared; in the *in vitro* culture group, abundant chondrocytes proliferated in a disordered arrangement. Immunohistochemistry staining showed: the absorbance (A) values in the intracavitary culture group showed a continuous increase, but no obvious change was in the other two groups. Moreover, at 4, 8 and 12 weeks of culture, A values in the control group and intracavitary culture group were significantly higher than that in the *in vitro* culture group ($P < 0.05$); at 4 and 8 weeks, A value in the intracavitary culture group was significantly lower than that in the control group ($P < 0.05$), but at 12 weeks, there was no significant difference in A value between the two groups ($P > 0.05$). These results suggest that the tissue-engineered cartilage can be constructed by bone marrow mesenchymal stem cells co-cultured with allogenic bone under *in vitro* and *in vivo* environment, especially in the articular cavity.

Subject headings: Stem Cells; Mesenchymal Stem Cells; Cartilage; Cell Culture Technology; Tissue Engineering

Cite this article: Gao FG, Zhou BS, Mu HB. Bone marrow mesenchymal stem cells co-cultured with allogenic bone in the articular cavity. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2016;20(19):2756-2762.

0 引言 Introduction

关节腔是一个缺血缺氧的环境, 所以一旦出现损伤, 关节软骨很难自身修复^[1]。而现行的修复方法均不理想, 其中, 全关节置换恢复慢、风险高且置换假体具有一定的寿命, 不能一劳永逸^[2]。通过药物方式进行治疗只起到缓解的作用, 实际效果并不明显。使用自体软

骨修复需要两次手术, 组织结构的耐受力又十分有限, 也容易造成其他部位的损伤^[3-4]。随着干细胞理论和技术不断发展, 在人体中具有自我修复能力的干细胞也被应用到关节软骨缺损领域。

在进行组织工程关节软骨构建的时候, 同种异体骨和骨髓来源的间充质干细胞是常用的支架材料和种子

细胞^[5]。而局部的实际理化环境与各种生长因子, 以及力学刺激等均会对组织工程软骨产生极大的影响, 在进行组织工程软骨构建的时候, 通过构建一定的环境条件, 利用各种理化因子和局部血运等因素以更快的速度获得质量更好的组织工程软骨^[6]。

实验即选择利用同种异体骨与骨髓间充质干细胞进行组织工程软骨构建, 于动物关节腔内培养。并与体外环境下的组织工程软骨培养效果进行比较, 以了解腔内培养的效果与可行性等。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学水平, 对比观察实验。

1.2 材料

实验动物: 5只新生新西兰白兔, 体质量0.5–1.0 kg, 4–6周龄, 均为雄性, 用于种子细胞制备。成年新西兰白兔16只, 体质量2.5–3.5 kg, 均为雄性, 其中1只用于支架材料制备, 15只用于关节腔内实验观察。实验动物均饲养于滨州医学院烟台附属医院动物中心SPF环境, 常规喂养。研究相关方案均提交本院医学伦理部门审核, 并经批准, 符合相关伦理学要求。

关节腔内同种异体骨与骨髓间充质干细胞培养实验中使用的主要试剂和仪器:

试剂及仪器	来源
胰蛋白酶	上海朗顿生物科技有限公司
PBS	北京博润莱特科技有限公司
二氧化碳恒温培养箱	上海生化试剂抚生有限公司
青霉素	南宁东恒华道生物科技有限责任公司
免疫组化染色试剂盒	上海雅心生物技术有限公司
苏木精-伊红	上海谷研科技有限公司
细胞裂解液	北京凌峰源生物科技有限公司
离心机	湖南湘仪离心机仪器有限公司
倒置显微镜	北京瑞科中仪科技有限公司

1.3 实验方法

1.3.1 种子细胞制备 取5只新生新西兰白兔, 麻醉后处死, 无菌条件下获得双侧股骨、胫骨、肱骨、髌骨, 剪断双侧干骺端, 利用无菌的PBS对髓腔进行冲洗获得冲洗液, 离心后弃上清、裂解, 制备细胞悬液, 并进行接种。获得P3细胞进行软骨定向诱导^[7]。诱导14 d后, 胰蛋白酶消化, 制备细胞悬液, 对细胞进行调整, 调整为 $2 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 作为实验所需种子细胞。

1.3.2 支架材料制备 取1只成年新西兰白兔麻醉后处死, 获得髌骨及椎体骨, 常规清洗、脱水、脱脂等, 制备为圆柱状标本(高3 mm、直径3.3 mm), 脱水、风干后利用10%PBS进行浸泡。72 h之后取出, 风干后分装, 环氧乙烷灭菌, 妥善保存备用^[8]。

1.3.3 细胞-载体复合物的构建^[9] 取30块支架材料, 浸入16孔板中的种子细胞悬液中, 待细胞悬液完全浸透骨块之后进行分组。每组15块, 分别设为腔内培养组和体外培养组。

1.3.4 细胞-载体复合物体外培养 将16孔板置于二氧化碳恒温培养箱中进行培养, 6 h之后完全培养基(含双抗和体积分数10%的胎牛血清)继续培养。

1.3.5 细胞-载体复合物关节腔内培养 取1只成年新西兰白兔麻醉后获得背部肌肉筋膜和腰背筋膜, 修剪为膜片, 大小1.0–1.5 cm。取出16孔板内的细胞-载体复合物, 利用修剪的膜片进行包裹, “0”号线缝合之后, 植入15只新西兰白兔右侧膝关节腔内^[10]。术后进行青霉素肌肉注射3 d以抗感染。术后常规喂养, 不限制其活动。正常对照组设为同腔内正常软骨。

1.4 主要观察指标 术后第4, 8, 12周, 分别处死5只动物, 取材后与体外培养组一同进行标本检测, 行苏木精-伊红染色组织学观察及II型胶原免疫组织化学染色观察。

1.5 统计学分析 对研究过程中获得的数据进行收集, 使用的统计学软件为SPSS 18.0。计算P值, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 关节腔内观察实验纳入15只成年新西兰白兔, 全部进入结果分析, 无脱失。

2.2 兔骨髓间充质干细胞培养结果 对兔骨髓间充质干细胞进行原代培养, 培养后1 d后, 出现少量细胞贴壁生长。接种3 d, 贴壁生长细胞数量增加。经传代培养, 细胞呈旋涡状或螺旋状, 传至第3代未出现明显的改变(见图1)。

2.3 兔骨髓间充质干细胞成骨诱导结果 对第3代骨髓间充质干细胞进行软骨定向诱导之后, 连续培养2周, 可观察到细胞周围出现基质分泌(见图2)。

2.4 同种异体骨形态观察 制备得到的同种异体骨支架材料触之具有一定的轻度和韧性, 可剪裁为不同的大小(见图3)。

经电镜扫描, 材料呈疏松多孔状结构(见图4)。

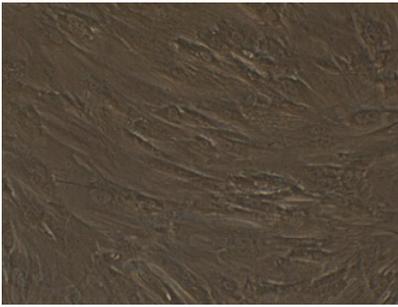


图1 兔骨髓间充质干细胞培养(×100)
Figure 1 Culture of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells (×100)

图注: P3 兔骨髓间充质干细胞形态均匀, 呈平形状排列。

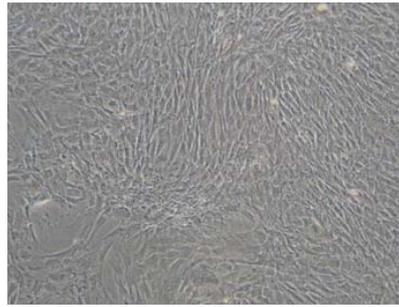


图2 兔骨髓间充质干细胞成骨诱导(×100)
Figure 2 Osteogenic induction of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells (×100)

图注: 成骨诱导2周, 兔骨髓间充质干细胞周围出现基质分泌。



图3 同种异体骨支架材料外观
Figure 3 Appearance of allogeneic bone scaffold material

图注: 同种异体骨支架触之具有一定的轻度和韧性, 可剪裁。

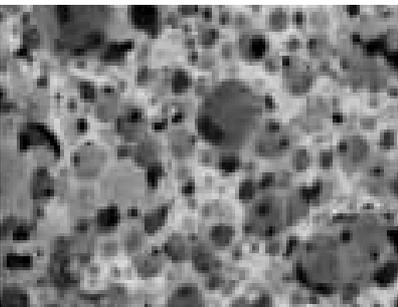


图4 同种异体骨支架材料电镜扫描(标尺: 100 μm)
Figure 4 Scanning electron microscope observation of allogeneic bone scaffold material (scale bar: 100 μm)

图注: 电镜扫描可见同种异体骨材料呈疏松多孔状结构。

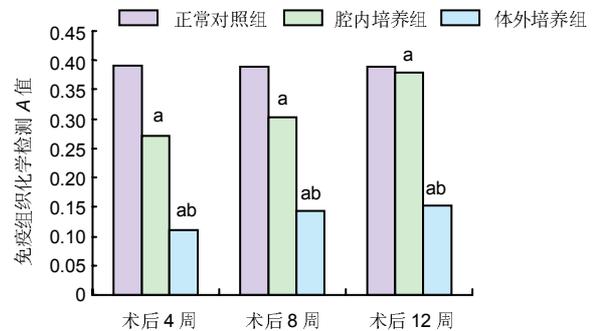


图5 各组培养4, 8, 12周的胶原免疫组织化学检测A值比较
Figure 5 Comparison of absorbance values by type II collagen immunohistochemistry staining among groups at 4, 8 and 12 weeks of culture

图注: 较之正常对照组, ^aP < 0.05; 较之腔内培养组, ^bP < 0.05。

表1 各组培养4, 8, 12周的胶原免疫组织化学检测A值比较 (x̄±s, n=5)

Table 1 Comparison of absorbance values by type II collagen immunohistochemistry staining at 4, 8 and 12 weeks of culture among groups

组别	术后4周	术后8周	术后12周
正常对照组	0.391 1±0.027 5	0.389 7±0.024 7	0.389 8±0.025 9
腔内培养组	0.271 5±0.015 9 ^a	0.302 5±0.024 9 ^a	0.379 8±0.026 8
体外培养组	0.110 2±0.011 9 ^{ab}	0.142 3±0.012 9 ^{ab}	0.152 9±0.021 9 ^{ab}

表注: 较之正常对照组, ^aP < 0.05; 较之腔内培养组, ^bP < 0.05。

2.5 术后动物情况观察 对新西兰白兔进行同种异体骨-骨髓间充质干细胞复合物膝关节腔内植入之后, 未出现明显的排异反应。

术后切口干燥, 未出现渗出、红肿, 动物活动正常, 未出现明显的关节活动受限。术后动物均正常饮食, 未

出现动物死亡。

2.6 苏木精-伊红染色结果 培养12周后进行苏木精-伊红染色和观察, 可见: ①正常对照组: 细胞质和软骨基质出现红染, 细胞核出现蓝染, 软骨细胞按照一定的方向呈紧密状有序排列。②腔内培养组: 细胞质和软骨基质出现红染, 细胞核出现蓝染, 支架材料基本吸收。软骨细胞长入支架之中, 细胞按照一定应力方向排列, 且形态变小。③体外培养组: 软骨细胞出现大量增殖, 但呈无序状排列。

2.7 免疫组织化学染色结果 经免疫组织化学染色和观察, 正常对照软骨细胞外基质中可发现大量棕黄色颗粒, 经II型胶原染色呈现出强阳性。腔内培养组经II型胶原染色呈现出阳性, 胞浆和基质均为棕黄色, 且随着时间的不断推移, 棕黄色颗粒数量越来越多。

4周体外培养组可观察到出现少量II型胶原表达的情况; 8周时胞周存在棕黄色颗粒; 12周经免疫组织化学反应II型胶原呈强阳性, 软骨细胞胞浆及胞外基质可

观察到少量的黄色颗粒。

经计数可得, 随着培养时间的推移, 腔内培养组的A值呈现出不断上升的情况, 体外培养组和正常对照组均未出现明显的改变。且培养4, 8, 12周, 正常对照组和腔内培养组的A值均显著高于体外培养组($P < 0.05$)。培养4, 8周, 腔内培养组的A值均显著低于正常对照组($P < 0.05$)。但培养12周, 两组之间A值经比较差异无显著性意义($P > 0.05$)。具体结果见表1及图5。

3 讨论 Discussion

受到外伤或者疾病的影响, 极易导致关节软骨缺损的出现^[11]。临床治疗不同类型软骨缺损的时候, 主要采用两种方法。一种是关节镜下治疗, 包括软骨磨削和软骨下骨钻孔术以及微骨折术等^[12-14]。这一方法可以获得一定的效果, 但受到缺损周围软骨退变等因素的影响, 容易出现无法愈合的情况, 治疗效果不佳^[15]。另一种是进行自体、异体软骨组织移植方式进行治疗, 包括自体软骨移植和异体软骨移植或者软骨细胞移植治疗等^[16-18]。

通过移植治疗, 可以一定程度上缓解患者的各项临床症状, 促进其功能的恢复。但是, 常规的移植治疗同样存在十分明显的局限性和不足之处^[19-22]。例如, 自体软骨移植来源有限, 并容易导致供区出现不同程度的损伤, 引发各种并发症的出现等。而异体软骨移植则存在免疫排斥反应问题, 术后效果不佳^[23]。随着组织工程学相关理论和技术的不断发展, 各种形式的组织工程化软骨开始被不断的构建出来。在进行组织工程软骨构建的过程中, 需要使用一定的支架材料和种子细胞^[24]。其中, 同种异体骨经去抗原免疫、深低温冷冻等处理, 抗原性极低, 且具有良好的孔隙结构和生物相容性, 可以为种子细胞的生长提供所需的空间, 是一种十分理想的支架材料^[25-27]。

骨髓间充质干细胞具有很强的分化潜能, 取材方便, 对供体损伤小, 体外培养简单、快捷。且经大量培养、增殖之后仍然可以长期保持原有的细胞表型。在一定的条件下, 对骨髓间充质干细胞进行软骨定向诱导, 还可以促使其向软骨方向进行分化^[28]。因此, 在进行组织工程软骨构建的时候, 骨髓来源的间充质干细胞是一种理想的种子细胞^[29]。

在将构建的组织工程软骨植入局部进行修复治疗的过程中, 会受到局部微环境的较大影响。局部的实

际理化环境与各种生长因子, 以及力学刺激等均会对组织工程软骨产生极大的影响, 并直接影响到软骨修复效果^[30-33]。为此, 在进行组织工程软骨构建的时候, 可以尝试通过一定的方式, 利用各种理化因子和局部血运等因素以更快的速度获得质量更好的组织工程软骨^[34-36]。

国内有学者从应力角度分析组织工程软骨的构建效果^[37], 通过对不同应力环境下的骨髓间充质干细胞在关节软骨缺损修复方面效果的比较和分析, 发现在正常的应力状态下, 可以获得最佳的软骨缺损修复效果。即表明在进行组织工程软骨修复组织的形成和维持过程中, 保持一个正常的负重关节应力刺激状态十分重要。国外有学者通过对软骨细胞进行周期性压力加压的方式^[38], 分析软骨细胞的生长情况。通过研究发现, 接受周期性压力加压的软骨细胞生长十分活跃, 较之无压力状态下的软骨细胞, 在I型胶原 mRNA 表达水平方面出现显著增加的情况, 蛋白聚糖水平也明显上升。

在此次实验中, 选择构建组织工程软骨进行体外培养和关节腔内培养。通过研究发现, 经免疫组织化学染色和观察, 腔内培养组经II型胶原染色呈现出阳性, 胞浆和基质均为棕黄色, 且随着时间的不断推移, 棕黄色颗粒数量越来越多。4周体外培养组可观察到出现少量II型胶原表达的情况, 8周时胞周存在棕黄色颗粒, 12周经免疫组织化学反应II型胶原呈强阳性, 软骨细胞胞浆及胞外基质可观察到少量的黄色颗粒。且随着培养时间的推移, 腔内培养组的A值呈现出不断上升的情况, 培养12周, 与正常对照组之间A值经比较差异无显著性意义。即表明在体外培养情况下, 组织工程软骨的生化特性和遗传特性等出现了一定的变化。分析出现这一结果的原因, 可能是因为在体外培养环境下营养微环境和力学效果等与体内环境之间存在极大的差异^[39]。而腔内培养组则为组织工程软骨提供了真实的体内环境, 包括一定的力学刺激和营养条件等^[40-41]。

文章结果还显示, 培养12周后腔内培养组细胞质和软骨基质出现红染, 细胞核出现蓝染, 支架材料基本吸收。软骨细胞长入支架之中, 细胞按照一定应力方向排列, 且形态变小。体外培养组软骨细胞出现大量增殖, 但呈无序状排列。即表明, 在关节腔内环境下, 实验所构建的组织工程软骨生长良好, 种子细胞在支架材料上呈现出良好的生长和增殖状态。

综上所述, 在体外和关节腔内环境下, 均可以利用同种异体骨与骨髓间充质干细胞复合培养获得组织工

程软骨, 但关节腔内培养可以获得更好。

致谢: 对研究过程的相关参与人员以及为此次研究提供帮助的机构和人员表示感谢。

作者贡献: 所有作者均负责实验设计、实施、数据分析整理以及文章的撰写。

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: 文章经国内小同行外审专家双盲外审, 符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 第一作者对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。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] 肖丰伟.骨髓间充质干细胞联合异体骨治疗骨缺损的实验研究[D].泰山医学院,2010.
- [2] 王斌,吕浩然,王伟雄,等.异体皮质人工骨复合物治疗骨折不愈合及骨缺损[J].中国组织工程研究,2013,17(51):8821-8826.
- [3] Han Y,Lan N,Pang C, et al.Bone marrow-derived mesenchymal stem cells enhance cryopreserved trachea allograft epithelium regeneration and vascular endothelial growth factor expression. Transplantation: Official Journal of the Transplantation Society. 2011, 92(6):620-626.
- [4] Lee JY,Choi MH,Shin EY, et al. Autologous mesenchymal stem cells loaded in Gelfoam for structural bone allograft healing in rabbits. Cell Tissue Bank. 2011;12(4):299-309.
- [5] Dong JL, Li LX, Mu WD, et al. Bone Regeneration with BMP-2 Gene-modified Mesenchymal Stem Cells Seeded on Nano-hydroxyapatite/Collagen/Poly(L-Lactic Acid) Scaffolds.J Bioact Compat Polymer. 2010;25(6):547-566.
- [6] 朱肖奇,贺用礼,马雪峰,等.生物衍生骨与骨髓间充质干细胞复合修复兔桡骨大段缺损[J].中国组织工程研究与临床康复,2009,13(3):417-422.
- [7] Tran CT,Gargiulo C,Thao HD, et al.Culture and differentiation of osteoblasts on coral scaffold from human bone marrow mesenchymal stem cells. Cell Tissue Bank.2011;12(4):247-261.
- [8] Reinders ME, de Fijter JW, Roelofs H, et al. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for the treatment of allograft rejection after renal transplantation:Results of a phase I study. Stem Cells Trans Med. 2013;2(2):107-111.
- [9] 江标,李明.骨组织工程中骨髓间充质干细胞与细胞因子的研究进展[J].重庆医学,2006,35(24):2290-2293.
- [10] 黄相杰,姜红江,孟鹏,等.自体间充质干细胞移植异体韧带重建治疗膝交叉韧带损伤[J].中国实用医药,2011,6(36): 92-95.
- [11] Itakura S,Asari S,Rawson J, et al.Mesenchymal stem cells facilitate the induction of mixed hematopoietic chimerism and islet allograft tolerance without GVHD in the rat. Am J Trans. 2007;7(2):336-346.
- [12] Tang TT, Lu H, Dai KR, et al.Osteogenesis of freeze-dried cancellous bone allograft loaded with autologous marrow-derived mesenchymal cells. Mat Sci Eng. 2002;20(1/2):57-61.
- [13] 刘彩云.骨髓间充质干细胞联合异体骨治疗蒙古羊胫骨缺损的实验研究[D].内蒙古农业大学,2014.
- [14] 刘阳.富集骨髓间充质干细胞复合nHA/CS材料修复兔骨缺损的实验研究[D].南方医科大学,2011.
- [15] 王宏彬.同种异体骨髓间充质干细胞的研究现状[J].中国组织工程研究,2012,16(23):4306-4309.
- [16] 杨楠,何惠宇,胡杨,等.复合骨髓间充质干细胞同种异体支架骨修复羊髌骨极限缺损[J].中国组织工程研究,2013,17(16):2859-2868.
- [17] 刘晓阳,李广润,刘洪涛,等.硫酸钙人工骨/骨髓间充质干细胞构建组织工程化骨诱导脊柱融合[J].中国组织工程研究,2014,18(21):3281-3286.
- [18] Zhang Q, Yang H, Wei YG, et al. Selection of Destination Ports of Inland-Port-Transferring RHCTS Based on Sea-Rail Combined Container Transportation.// Innovation and sustainability of modern railway: Third international symposium on Innovation and sustainability of modern railway (ISMR 2012), September 20-21, 2012, Nanchang, China, 2012:675-680.
- [19] Khojasteh A, Eslaminejad MB, Nazarian H, et al. Vertical bone augmentation with simultaneous implant placement using particulate mineralized bone and mesenchymal stem cells: a preliminary study in rabbit. J Oral Implantol. 2013;39(1):3-13.
- [20] Wei X,Mao Z,Hou Y, et al. Local administration of TGFbeta-1/VEGF165 gene-transduced bone mesenchymal stem cells for Achilles allograft replacement of the anterior cruciate ligament in rabbits. Biochem Biophys Res Comm. 2011;406(2):204-210.

- [21] 谭新颖. 同种异体骨髓间充质干细胞复合同种异体冻干骨修复比格犬半侧下颌骨缺损的实验研究[D]. 中国人民解放军医学院, 2014.
- [22] 邢志远, 张继波, 孔令菊, 等. 深低温冻存羟基磷灰石/骨髓间充质干细胞修复兔桡骨缺损[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(25):4629-4636.
- [23] 刘昌奎, 谭新颖, 徐娟, 等. 骨髓间充质干细胞复合同种异体骨支架体内构建组织工程骨修复踝突缺损的实验研究[C]. //2013年全国第五届口腔颌面外科修复重建学术会议暨国际研讨会论文集. 2013:54-55.
- [24] Vulcano E, Murena L, Falvo DA, et al. Bone marrow aspirate and bone allograft to treat acetabular bone defects in revision total hip arthroplasty: Preliminary report. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2013;17(16): 2240-2249.
- [25] Kuo YR, Chen CC, Shih HS, et al. Prolongation of composite tissue allotransplant survival by treatment with bone marrow mesenchymal stem cells is correlated with T-cell regulation in a Swine hind-limb model. *Plastic Reconstruct Surg.* 2011;127(2):569-579.
- [26] Nather A, David V, Teng JW, et al. Effect of autologous mesenchymal stem cells on biological healing of allografts in critical-sized tibial defects simulated in adult rabbits. *Ann Acad Med.* 2010;39(8):599-606.
- [27] 刘昌奎, 谭新颖, 徐娟, 等. 骨髓间充质干细胞复合同种异体骨支架体内构建组织工程骨修复踝突缺损的实验研究[C]. //第五届全国口腔颌面修复重建外科学术会议暨国际研讨会论文集. 2013:54-55.
- [28] 李涛, 宋国栋, 包崇云, 等. 骨髓间充质干细胞作为干细胞参与生物材料异位诱导成骨[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(21):3819-3822.
- [29] 费志强. BMP-2基因修饰的骨髓间充质干细胞复合 PLLA/n-HA人工骨修复大鼠股骨缺损的实验研究[D]. 中山大学, 2013.
- [30] 李光辉. 外周血CD34⁺细胞与骨髓间充质干细胞共培养修复兔颅骨缺损的实验研究[D]. 第四军医大学, 2013.
- [31] 王小志. 基因转染骨髓间充质干细胞复合同种异体骨修复羊髌骨极限缺损[D]. 新疆医科大学, 2014.
- [32] Hara Y, Stolk M, Ringe J, et al. In vivo effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a rat kidney transplantation model with prolonged cold ischemia. *Transpl Int.* 2011;24(11):1112-1123.
- [33] Aksu AE, Horibe E, Sacks J, et al. Co-infusion of donor bone marrow with host mesenchymal stem cells treats GVHD and promotes vascularized skin allograft survival in rats. *Clin Immunol.* 2008;127(3):348-358.
- [34] 钱三祥. 兔同种异体脱钙骨复合骨髓间充质干细胞体外培养的成软骨观察[D]. 安徽医科大学, 2011.
- [35] 王小志, 何惠宇, 杨楠, 等. 基因转染骨髓间充质干细胞复合同种异体骨修复绵羊极限骨缺损[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(47):8141-8148.
- [36] 刘杰, 许建中, 王序全, 等. 脱钙骨基质支架构建组织工程骨的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(9):888-891.
- [37] 景彩霞, 刘昌奎, 谭新颖, 等. 骨髓间充质干细胞与同种异体骨复合修复犬下颌骨缺损: 成骨能力检测[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(14):2138-2143.
- [38] 王刚, 刘一, 单玉兴, 等. 不同应力环境对兔骨髓间充质干细胞修复关节软骨缺损的影响[J]. 中国修复重建外科杂志, 2004, 18(2):96-99.
- [39] Smith RL, Lin J, Trindade MC, et al. Time-dependent effects of intermittent hydrostatic pressure on articular chondrocyte type II collagen and aggrecan mRNA expression. *J Rehabil Res Dev.* 2000;37:153-161.
- [40] 赵子义, 杨雷, 徐鹏, 等. 同种异体骨髓间充质干细胞关节腔内成软骨分化的实验研究[J]. 中华外科杂志, 2005, 43(20): 1340-1343.
- [41] 徐斌, 宣涛, 徐洪港, 等. 骨髓间充质干细胞与同种异体脱钙骨基质组合生长因子诱导向软骨细胞分化[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(21):3822-3828.