

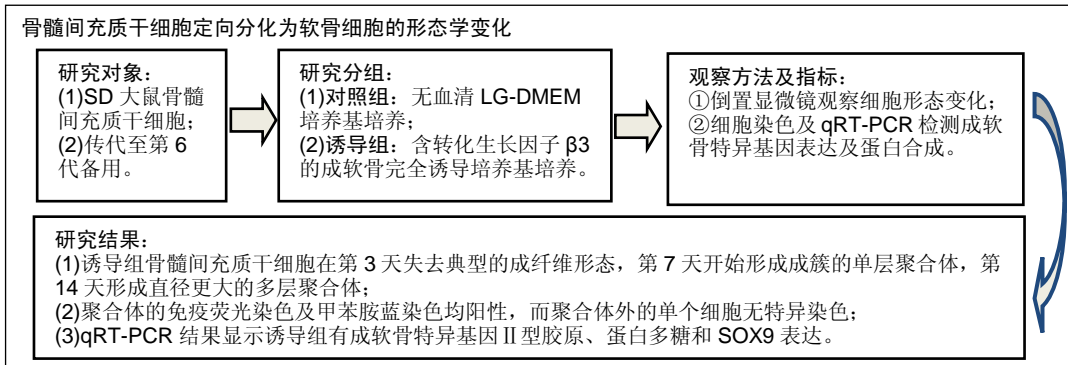
骨髓间充质干细胞体外成软骨分化的形态学变化

王志聪¹, 刘跃洪¹, 周庆¹, 陈曦¹, 周宇¹, 孙慧君², 刘谟震³ (1德阳市人民医院骨科, 四川省德阳市 618000; 2大连医科大学药学院, 辽宁省大连市 116044; 3大连医科大学附属第一医院骨科, 辽宁省大连市 116011)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0661

ORCID: 0000-0001-6252-5062(王志聪)

文章快速阅读:



王志聪, 男, 1988 年生, 硕士, 医师, 主要从事关节软骨损伤组织工程修复方面的研究。

通讯作者: 刘跃洪, 主任医师, 德阳市人民医院骨科, 四川省德阳市 618000

并列通讯作者: 刘谟震, 博士, 主任医师, 教授, 硕士生导师, 大连医科大学附属第一医院骨科, 辽宁省大连市 116044

中图分类号:R394.2

文献标识码:A

稿件接受: 2018-07-12



Wang Zhi-cong, Master, Physician, Department of Orthopedics, People's Hospital of Deyang City, Deyang 618000, Sichuan Province, China

Corresponding author: Liu Yue-hong, Chief physician, Department of Orthopedics, People's Hospital of Deyang City, Deyang 618000, Sichuan Province, China

Corresponding author: Liu Mo-zhen, MD, Chief physician, Professor, Master's supervisor, Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning Province, China

文题释义:

转化生长因子 $\beta 3$: 在哺乳动物胚胎发育过程中, 能够促进形态发生, 并对脊椎形成、肢端发芽、面骨形成及心脏瓣膜的形成起重要作用。转化生长因子 $\beta 3$ 可调控骨形成, 影响成年骨再生。

SOX9 基因: 是一种重要的早期胚胎发育相关基因, 是前软骨细胞浓聚所必需的因子, 促进成骨的同时也抑制骨骺细胞的终末分化, 以延长软骨发育成熟过程, 抑制软骨细胞凋亡, 并指导 II 型胶原和蛋白多糖的合成, 有利于骨骼在生长发育阶段形成复杂的形状和结构。

摘要

背景: 骨髓间充质干细胞在向软骨细胞分化过程中可形成聚合体, 但是该形态学特点是否可代表骨髓间充质干细胞已经成软骨分化尚无研究报道。

目的: 观察骨髓间充质干细胞成软骨分化过程中聚合体的形成和成软骨分化情况。

方法: 体外培养大鼠骨髓间充质干细胞, 传代至第 6 代时备用。对照组用无血清 LG-DMEM 培养基培养 14 d, 诱导组用含转化生长因子 $\beta 3$ 的成软骨完全诱导培养基培养 14 d, 倒置显微镜观察诱导过程中细胞形态变化; 免疫荧光染色、甲苯胺蓝染色、qRT-PCR 检测成软骨特异指标 II 型胶原、蛋白多糖和成软骨转录因子 SOX9 的基因表达及蛋白合成情况。

结果与结论: ①与对照组相比, 诱导组骨髓间充质干细胞在第 3 天失去典型的成纤维形态, 第 7 天开始形成成簇的单层聚合体, 第 14 天形成直径更大的多层聚合体; ②聚合体的免疫荧光染色及甲苯胺蓝染色均阳性, 而聚合体外的单个细胞无特异染色; ③qRT-PCR 亦证实诱导组有成软骨特异基因 II 型胶原、蛋白多糖和 SOX9 表达; ④上述研究结果提示骨髓间充质干细胞成软骨分化过程中聚合体的形成可作为成软骨分化的一种形态学检测指标。

关键词:

骨髓间充质干细胞; 成软骨分化; 软骨细胞; 聚合体; 形态学; II 型胶原; 蛋白多糖; SOX9 转录因子; 干细胞; 国家自然科学基金

主题词:

骨髓; 间充质干细胞; 细胞分化; 软骨细胞; 胶原 II 型; SOX9 转录因子; 组织工程

基金资助:

国家自然科学基金(81273508, 81350017); 2017 年四川省卫生和计划生育委员会重点科研项目(17ZD023)

缩略语:

骨髓间充质干细胞: bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs

Morphological characteristics of bone marrow mesenchymal stem cells differentiating into chondrocytes *in vitro*

Wang Zhi-cong¹, Liu Yue-hong¹, Zhou Qing¹, Chen Xi¹, Zhou Yu¹, Sun Hui-jun², Liu Mo-zhen³ (1Department of Orthopedics, People's Hospital of Deyang City, Deyang 618000, Sichuan Province, China; 2School of Clinical Pharmacology, Dalian Medical University, Dalian 116044, Liaoning Province, China; 3Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) can compact to form aggregates during chondrogenic differentiation, but whether the formation of aggregation is a prerequisite for chondrogenic induction is not yet documented.

OBJECTIVE: To observe the morphological characteristics of BMSCs differentiating into chondrocytes.

METHODS: BMSCs were cultured *in vitro* and passage 6 cells were used for the following experiments. Cells were induced in serum-free LG-DMEM medium as control group or in complete chondrogenic induction medium containing transforming growth factor β 3 as induction group for 14 days. Cellular morphology during differentiation process was observed by inverted microscope. Chondrocyte-specific markers, including type II collagen, aggrecan and chondrogenic transcription factor SOX9, were evaluated by immunofluorescence, toluidine blue staining and quantitative RT-PCR.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with the control group, the cells began to lose the typical morphology at day 3 of chondrogenic induction, and then compacted to form mono-layered aggregates and multi-layered aggregates at days 7 and 14, respectively. The aggregates were positive for immunofluorescence and toluidine blue staining, while no staining was detected in the single cells. qRT-PCR results also confirmed the mRNA expression of type II collagen, aggrecan and SOX9 in the cells after chondrogenic induction. Therefore, these abovementioned results suggest that the formation of aggregation in BMSCs can be one of morphological markers of chondrogenic differentiation.

Subject headings: Bone Marrow; Mesenchymal Stem Cells; Cell Differentiation; Chondrocytes; Collagen Type II; SOX9 Transcription Factor; Tissue Engineering

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81273508, 81350017; the Major Scientific Research Project of Sichuan Provincial Health and Family Planning Committee in 2017, No. 17ZD023

0 引言 Introduction

骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)具有向骨细胞、脂肪细胞、软骨细胞及神经样细胞分化的潜能,因此被众多研究者认为是组织工程最理想的种子细胞^[1-4]。新近研究显示, BMSCs在成软骨分化过程中会先聚合形成少量单层聚合体,再形成直径更大的多层聚合体^[5-9]。此外,肢体的软骨发育过程也是干细胞先迁移,然后聚集形成紧密的聚合体,最后向软骨细胞分化^[10-12]。然而,目前尚没有研究报道该形态学变化是否可作为BMSCs成软骨分化的检测指标,因此,实验拟探索BMSCs成软骨分化过程中聚合体的形成和成软骨分化情况。

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 实验于2013年5至12月在大连医科大学药学院完成。

1.3 材料 低糖DMEM细胞培养液、优级胎牛血清(Hyclone公司);成软骨诱导分化完全培养基(广州赛业公司);兔抗大鼠II型胶原抗体(GeneTex公司);兔抗大鼠蛋白多糖抗体(Millipore公司);兔抗大鼠SOX9抗体(Abcam公司);甲苯胺蓝(Sigma公司);细胞培养箱(Thermo公司);倒置生物相差显微镜(Olympus公司);荧光显微镜(Leica公司);PCR仪(Applied Biosystems公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 BMSCs培养与成软骨诱导分化 SD大鼠BMSCs购于广州赛业公司(货号:RASM-01001),细胞表面的特异指标CD29、CD44和CD90均大于95%,而CD34、CD45和CD11b均小于2%,同时具有向软骨细胞、骨细胞和脂肪细胞分化的潜能,符合国际细胞治疗学会所制定的标准^[13]。用含体积分数为10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 mg/L链霉素的LG-DMEM培养基培养,每2 d更换1次

培养基,当细胞融合率达到90%左右时,用0.25%胰蛋白酶消化细胞,按1:2传代培养。传代培养至第6代时备用。

参照Glennon-Alty等^[8]研究进行成软骨诱导分化。取生长状态良好的第6代BMSCs以 1×10^4 /孔的数量接种于24孔板,孵箱内过夜,待细胞贴壁后,随机分为2组:对照组(用无血清LG-DMEM培养基培养);诱导组(用含转化生长因子 β 3的成软骨完全诱导培养基培养)。每孔各加入0.5 mL相应培养基,隔日换液,倒置生物相差显微镜观察细胞形态变化,共诱导14 d。诱导培养基的成分包括成软骨分化诱导基础培养基、0.1 μ mol/L地塞米松、50 mg/L抗坏血酸、1%胰岛素-转铁蛋白-硒(ITS)、100 mg/L丙酮酸钠、40 mg/L脯氨酸及10 μ g/L转化生长因子 β 3,每次换液时加入新鲜转化生长因子 β 3。

1.4.2 成软骨分化的组织学鉴定 诱导至14 d时弃去上清,PBS洗涤3次 \times 5 min,40 g/L多聚甲醛固定30 min后,分别进行:①免疫荧光染色:PBS洗涤3次 \times 5 min,以终止固定;将固定后的细胞用0.3%Triton \times 100透化10 min,PBS洗涤3次 \times 5 min;体积分数为5%胎牛血清室温封闭30 min,加入待检测一抗后置于湿盒,4 $^{\circ}$ C过夜;室温复温30 min,PBS洗涤3次 \times 5 min;滴加羊抗大鼠-FITC或羊抗大鼠-Cy3抗体(1:200)室温孵育1 h;DAPI染核3 min后于倒置荧光显微镜下观察。待测抗原包括:II型胶原(1:100)、蛋白多糖(1:200)、SOX9(1:300);②甲苯胺蓝染色:1%甲苯胺蓝液染色5 min,蒸馏水洗涤3次,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂封固。

1.4.3 qRT-PCR检测成软骨分化特异基因的表达 按照Trizol一步法分别提取总RNA,使用TransScript First-Strand cDNA Synthesis SuperMix反转录试剂盒将总RNA反转录为cDNA。反转录引物序列由Takara Biotechnology公司设计合成,具体如下:II型胶原上游5'-CGC CAC GGT CCT ACA ATG TC-3',下游5'-GTC ACC TCT GGG TCC TTG TTC AC-3';蛋白多糖上游

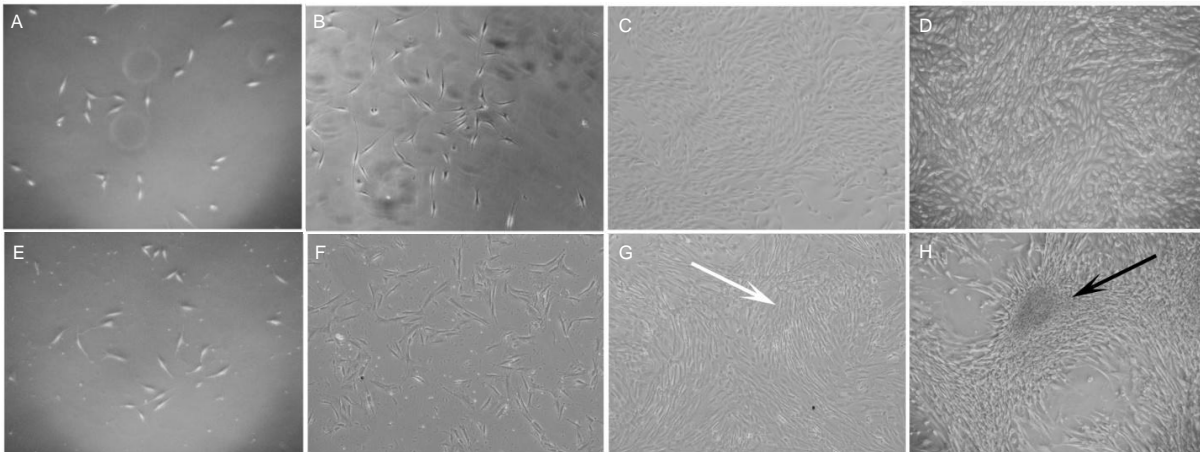


图1 成软骨诱导过程中骨髓间充质干细胞的形态学变化(倒置相差显微镜, ×100)

Figure 1 The morphological changes of bone marrow mesenchymal stem cells during chondrogenic differentiation under inverted phase contrast microscope (×100)

图注: 图中 A-D 为对照组培养第 1, 3, 7, 14 天, 细胞形态呈长梭形; E-H 为诱导组培养第 1, 3, 7, 14 天, 细胞聚集成聚合体(白色箭头示单层聚合体; 黑色箭头示多层聚合体)。

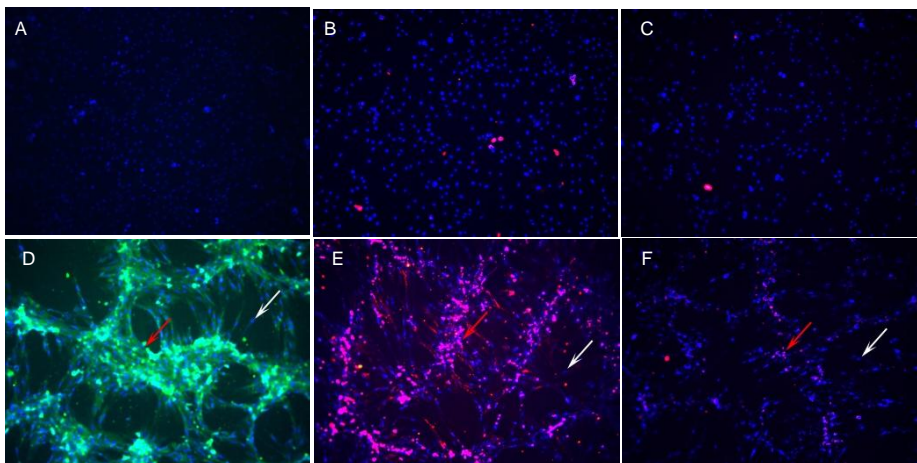


图2 成软骨特异指标 II 型胶原、蛋白多糖和 SOX9 的免疫荧光染色(×100)

Figure 2 The immunofluorescence staining of cartilage-specific markers, including type II collagen, aggrecan and SOX9 (×100)

图注: 图中 A-C 分别为对照组 II 型胶原、蛋白多糖和 SOX9 的免疫荧光染色, 可见无特异染色; D-F 分别为诱导组 II 型胶原、蛋白多糖和 SOX9 的免疫荧光染色, 均有明显染色(红色箭头示聚合体内细胞; 白色箭头示聚合体外单个细胞)。

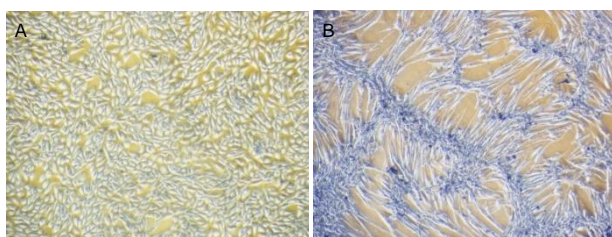


图3 成软骨诱导 14 d 后甲苯胺蓝染色(×100)

Figure 3 The toluidine blue staining after 14 days of chondrogenic induction (×100)

图注: 图中 A 为对照组, 细胞呈梭形, 无蓝染; B 为诱导组, 可见聚合体, 有明显蓝染。

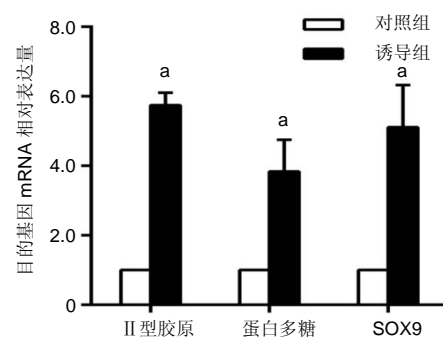


图4 软骨特异基因 II 型胶原、蛋白多糖和 SOX9 的 mRNA 表达

Figure 4 The gene expression of cartilage-specific markers, type II collagen, aggrecan and SOX9

图注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$ 。

5'-TGG CAT TGA GGA CAG CGA AG-3', 下游5'-TCC AGT GTG TAG CGT GTG GAA ATA G-3'; SOX9上游5'-GCA GAG ACT GAA GAC CCT ACA CAG A-3', 下游5'-GAG GCA ACT TCA CGC TGC AA-3'; GAPDH上游5'-TAT GAC TCT ACC CAC GGC AA-3', 下游5'-ATA CTC AGC ACC AGC ATC ACC-3'。用Trans-Start@Top Green

qPCR SuperMix扩增反应试剂盒进行qRT-PCR扩增, 每个反应3个复孔, 以GAPDH作为内参检测 II 型胶原、蛋白多糖和SOX9的基因表达。

1.5 主要观察指标 ①BMSCs诱导过程中倒置显微镜下观察形态学改变; ②免疫荧光染色、甲苯胺蓝染色及qRT-PCR检测BMSCs成软骨分化情况。

1.6 统计学分析 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用SPSS 16.0软件(SPSS, 美国)进行统计学分析, 组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 BMSCs成软骨分化后的形态学改变 见图1。倒置显微镜下观察, BMSCs在诱导第1天均呈现出典型的梭形或纺锤状, 第3天时诱导组失去这种典型形态, 第7天时, 诱导组在局部出现成簇的单层聚合体(图1G白色箭头所示), 第14天时, 形成直径更大的多层聚合体(图1H黑色箭头所示); 整个诱导过程中, 对照组均未发生明显形态变化。

2.2 BMSCs成软骨诱导分化后免疫荧光染色结果 对软骨细胞外基质的主要成分II型胶原和蛋白多糖进行免疫荧光染色(图2), 可见细胞胞浆出现特异染色, 而对照组无染色。成软骨分化的特异转录因子SOX9在BMSCs向软骨细胞分化过程中起到重要作用, 并可指导II型胶原和蛋白多糖的合成。因此, 进一步对SOX9进行免疫荧光染色, 结果显示诱导组出现与DAPI蓝色细胞核相重叠的红色染色, 而对照组无特异染色。此外, 还发现聚合体区域的II型胶原、蛋白多糖和SOX9染色较强(图2红色箭头), 聚合体外的单个细胞染色较弱或无特异染色(图2白色箭头)。

2.3 BMSCs成软骨诱导分化后甲苯胺蓝染色结果 对照组细胞仍然呈长梭形, 没有明显蓝染的细胞, 而诱导组细胞聚集成簇成紧密成簇的聚合体, 并有明显的蓝染, 聚合体外的单个细胞无明显染色(图3)。

2.4 BMSCs成软骨分化特异基因的表达 对诱导至14 d的细胞行qRT-PCR分析, 见图4。与对照组相比, 诱导组II型胶原、蛋白多糖和SOX9基因的表达分别提高5.75倍($t=17.26, P < 0.05$), 3.83倍($t=3.33, P < 0.05$)和5.11倍($t=9.71, P < 0.05$), 其中II型胶原基因表达水平上调尤为明显。

3 讨论 Discussion

由于软骨组织缺乏血管、神经及淋巴管, 此外损伤深度常常不能达到软骨下骨, 不能由BMSCs迁移进行修复, 因此关节软骨损伤不易自行愈合^[13]。目前对其没有良好的治疗方法, 而人口老龄化到来会加剧临床对软骨损伤的治疗压力。随着组织工程的迅速发展, 再生修复软骨缺损被认为是最有潜力的治疗方法^[3], 其治疗原理是基于间充质干细胞具有向软骨细胞分化的潜力而修复损伤。BMSCs具有来源充足、取材容易、易于培养、能够自我更新增殖和多向分化的潜能, 而被视为软骨组织工程最理想的种子细胞^[2-3]。该研究便以此为依据选用BMSCs作为研究对象。

大量研究显示, BMSCs既可在单层二维培养条件下, 又可在三维支架培养下经生长因子诱导向软骨细胞分化, 并修复动物模型的软骨缺损^[14-18]。在单层培养BMSCs向软骨细胞分化过程中, Glennon-Alty等^[8]发现BMSCs首先会

成簇聚集形成单层聚合体, 之后形成直径300-600 μm 的多层聚合体, 并且II型胶原染色在聚合体内部最强。该研究中作者也见到BMSCs从第7天开始在局部形成成簇的单层聚合体, 而到第14天时便形成直径更大的多层聚合体。免疫荧光染色和甲苯胺蓝亦可见聚合体区域的细胞外基质成分II型胶原和蛋白多糖染色较强, 而聚合体外的单个细胞染色较弱或无特异染色。SOX9是软骨发育形成中的重要转录因子, 对软骨的发育成熟等过程发挥重要的调节作用, 并且成软骨分化过程与II型胶原的表达呈正相关性^[19-21]。研究结果显示, 聚合体内的细胞有与DAPI蓝色细胞核相重叠的特异染色, 而聚合体外的单个细胞无此染色, 提示BMSCs的成软骨分化需要细胞与细胞以及细胞与聚合体内的基质接触^[22-25]。此外, qRT-PCR结果也进一步证实了诱导形成聚合体时期的细胞有II型胶原、蛋白多糖和SOX9的基因表达。然而, 刘霞等^[26]将软骨细胞与BMSCs直接接触共培养诱导其向软骨细胞分化, 发现细胞间直接接触不能够单独诱导BMSCs向软骨分化, 认为其不是软骨细胞与BMSCs混合共培养中发挥诱导作用的主要因素。更有研究显示在形成聚合体之前, BMSCs成软骨分化的特异基因已经开始表达, 由此他们认为BMSCs的成软骨分化早于聚合体的形成^[8]。部分研究采用非接触共培养诱导分化, 也发现软骨细胞可以诱导BMSCs或骨膜细胞向软骨细胞分化^[27-28]。Xu等^[29]观察到MSCs与软骨细胞非接触虽然可使干细胞的形态向软骨细胞改变, 但是会抑制干细胞在三维培养中形成聚合体, 同时也会减少软骨细胞外基质的沉积。

基于上述结果, 作者认为BMSCs向软骨细胞分化过程中聚合体的形成可反映细胞成软骨分化, 从而有助于对BMSCs成软骨诱导成熟的时间判断^[30]。但是实验未对聚合体形成之前的细胞进行成软骨分化鉴定, 因此还无法确定成软骨分化开始的确切时间, 对该问题还有待进一步研究。

致谢: 感谢大连医科大学药学院对实验的帮助与支持。

作者贡献: 实验设计为通讯作者, 实验实施为第一、三、四作者, 实验评估为第五、六作者, 资料收集为第一作者。第一作者成文, 通讯作者审核, 通讯作者对文章负责。

经费支持: 该文章接受了“国家自然科学基金(81273508, 81350017)”、“2017年四川省卫生和计划生育委员会重点科研项目(17ZD023)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题: 实验获得大连医科大学动物伦理学委员会批准。

写作指南: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告及医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

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。

生物统计学声明: 文章统计学方法经大连医科大学生物统计学专家审核。

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。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] 黄弘轩,张姝江,白波.调控骨髓间充质干细胞成软骨分化的研究进展[J].中华关节外科杂志(电子版),2017,11(6):655-660.
- [2] Fahy N, Alini M, Stoddart MJ.Mechanical stimulation of mesenchymal stem cells: Implications for cartilage tissue engineering.J Orthop Res. 2018;36(1):52-63.
- [3] 汪洪,邓志锋,赖贤良,等.骨髓间充质干细胞的体外培养及定向诱导分化[J].中国临床医学,2004,11(2):202-204.
- [4] Li G, Yu F, Lei T,et al.Bone marrow mesenchymal stem cell therapy in ischemic stroke: mechanisms of action and treatment optimization strategies.Neural Regen Res. 2016; 11(6):1015-1024.
- [5] Wang Z, Li K, Sun H, et al. Icaritin promotes stable chondrogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in self-assembling peptide nanofiber hydrogel scaffolds.Mol Med Rep. 2018;17(6):8237-8243.
- [6] Bearden RN, Huggins SS, Cummings KJ, et al. In-vitro characterization of canine multipotent stromal cells isolated from synovium, bone marrow, and adipose tissue: a donor-matched comparative study.Stem Cell Res Ther. 2017; 8(1):218.
- [7] Olvera D, Sathy BN, Carroll SF, et al. Modulating microfibrillar alignment and growth factor stimulation to regulate mesenchymal stem cell differentiation.ActaBiomater. 2017; 64:148-160.
- [8] Glennon-Alty L, Williams R, Dixon S, et al. Induction of mesenchymal stem cell chondrogenesis by polyacrylate substrates.ActaBiomater. 2013;9(4):6041-6051.
- [9] Wang ZC, Sun HJ, Li KH, et al. Icaritin promotes directed chondrogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells but not hypertrophy in vitro.Exp Ther Med. 2014; 8(5):1528-1534.
- [10] Ray P, Hughes AJ, Sharif M, et al. Lectins selectively label cartilage condensations and the oticneuroepithelium within the embryonic chicken head.J Anat. 2017;230(3):424-434.
- [11] Ray P, Chapman SC.Cytoskeletal Reorganization Drives Mesenchymal Condensation and Regulates Downstream Molecular Signaling.PLoS One. 2015;10(8):e0134702.
- [12] Shimizu H, Yokoyama S, Asahara H.Growth and differentiation of the developing limb bud from the perspective of chondrogenesis.Dev Growth Differ. 2007;49(6):449-454.
- [13] Lubis AM, Lubis VK.Adult bone marrow stem cells in cartilage therapy.Acta Med Indones. 2012;44(1):62-68.
- [14] 杨强,丁晓明,徐宝山,等.含软骨钙化层的仿生支架体内构建组织工程骨软骨[J].中华骨科杂志,2018,38(6):321-329.
- [15] Mohamed-Ahmed S, Fristad I, Lie SA, et al. Adipose-derived and bone marrow mesenchymal stem cells: a donor-matched comparison.Stem Cell Res Ther. 2018;9(1):168.
- [16] 孙皓,左健.组织工程化软骨细胞和骨髓间充质干细胞用于修复同种异体关节软骨缺损[J].中国组织工程研究, 2012,16(19): 3602-3605.
- [17] Ruan SQ, Yan L, Deng J, et al. Preparation of a biphasic composite scaffold and its application in tissue engineering for femoral osteochondral defects in rabbits.IntOrthop. 2017;41(9): 1899-1908.
- [18] 王奇,唐洪,曾伟南,等.骨髓间充质干细胞复合仿生凝胶修复猪关节软骨缺损[J].中华创伤杂志,2017,33(7):658-664.
- [19] Jiang X, Huang X, Jiang T, et al. The role of Sox9 in collagen hydrogel-mediated chondrogenic differentiation of adult mesenchymal stem cells (MSCs).Biomater Sci. 2018;6(6): 1556-1568.
- [20] 宋长志,徐小卒,吴亚,等.慢病毒介导的 Sox-9基因转染对大鼠关节软骨细胞炎症反应的影响[J].中华医院感染学杂志, 2016, 26(23):5342-5345.
- [21] 刘庆珍,吴尽,邓晓盟,等.软骨发育过程中负调控Sox9基因表达机制研究进展[J].农业科学与技术(英文版), 2017,18(6): 1038-1041.
- [22] Mao AS, Shin JW, Mooney DJ.Effects of substrate stiffness and cell-cell contact on mesenchymal stem cell differentiation. Biomaterials. 2016;98:184-191.
- [23] Cao B, Li Z, Peng R, et al. Effects of cell-cell contact and oxygen tension on chondrogenic differentiation of stem cells.Biomaterials. 2015;64:21-32.
- [24] de Windt TS, Saris DB, Slaper-Cortenbach IC, et al. Direct Cell-Cell Contact with Chondrocytes Is a Key Mechanism in Multipotent Mesenchymal Stromal Cell-Mediated Chondrogenesis.Tissue Eng Part A. 2015;21(19-20): 2536-2547.
- [25] 李拉,陈文庆,朱敬先,等.直接接触共培养技术在体外探索细胞间相互作用的应用研究[J].中国运动医学杂志, 2013,32(4): 337-342,352.
- [26] 刘霞,周广东,刘伟,等.细胞间直接接触诱导BMSC软骨分化的初步研究[J].组织工程与重建外科杂志,2010,6(2):70-74.
- [27] 田力,梁晓鹏,汪卓,等.体外非接触性共培养对MSC向软骨细胞诱导分化的实验观察[J].中国医药导报,2008,5(19):16-18.
- [28] Levorson EJ, Santoro M, Kasper FK, et al. Direct and indirect co-culture of chondrocytes and mesenchymal stem cells for the generation of polymer/extracellular matrix hybrid constructs. Acta Biomater. 2014;10(5):1824-1835.
- [29] Xu L, Wang Q, Xu F, et al. Mesenchymal stem cells downregulate articular chondrocyte differentiation in noncontact coculture systems: implications in cartilage tissue regeneration.Stem Cells Dev. 2013;22(11):1657-1669.
- [30] 冯均伟,王跃,吕波,等.骨髓间充质干细胞体外诱导成软骨细胞的动态观察[J].中国组织工程研究,2013,17(36):6409-6416.