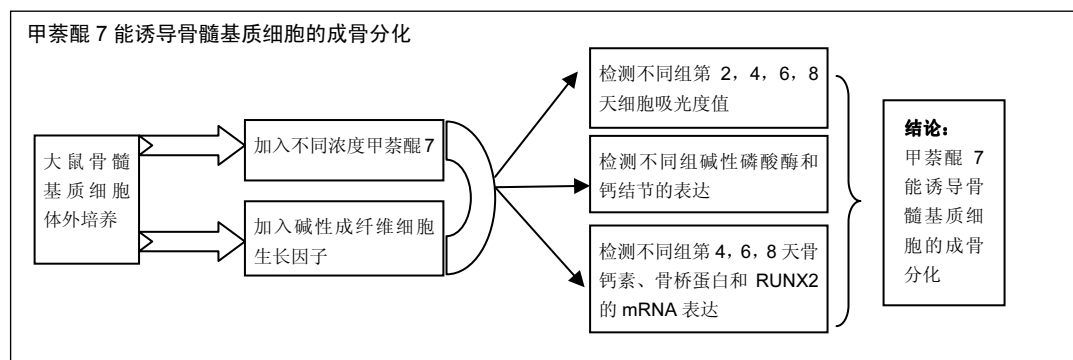


甲萘醌7对体外培养大鼠骨髓基质细胞分化的影响

徐 兵, 柳 园(广东省深圳市龙华区人民医院全科, 广东省深圳市 518109)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0431 ORCID: 0000-0003-4042-4249(徐兵)

文章快速阅读:



徐兵, 男, 1969 年生, 四川省人, 汉族, 主治医师。

通讯作者: 柳园。广东省深圳市龙华区人民医院全科, 广东省深圳市 518109

中图分类号:R394.2
文献标识码:A
稿件接受: 2018-01-05

文题释义:

骨髓基质细胞: 是存在于骨髓内, 有不定向多方向分化潜能的一类干细胞, 具有分化成骨细胞、软骨细胞、心肌细胞、骨骼肌细胞和脂肪细胞等细胞的潜能, 目前常用于细胞实验中。

甲萘醌 7: 是维生素 K2 最广泛、最强大的活性成分, 有抗骨质疏松等作用, 但在关于其在体外对骨髓基质细胞的诱导作用尚未见报道。

摘要

背景: 目前甲萘醌 7 的研究主要集中在其抗骨质疏松的作用方面, 关于其对体外细胞培养体系中大鼠骨髓基质细胞的作用尚不明确。

目的: 观察甲萘醌 7 对大鼠骨髓基质细胞增殖及分化的影响。

方法: 提取大鼠骨髓基质细胞, 体外培养扩增后, 种植骨髓基质细胞于细胞培养皿中, 分别用质量浓度 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} g/L 的甲萘醌 7 及 100 μ g/L 的碱性成纤维细胞生长因子诱导骨髓基质细胞增殖, 检测不同组骨髓基质细胞的相应吸光度值。于第 2, 4, 6 和 8 天检测骨髓基质细胞碱性磷酸酶水平和钙结节数量, 并检测骨钙素、骨桥蛋白和 Runx2 蛋白的 mRNA 表达情况。

结果与结论: ①细胞增殖: 甲萘醌 7 诱导的骨髓基质细胞增殖良好, 各浓度的甲萘醌 7 及碱性成纤维细胞生长因子组均有促进骨髓基质细胞增殖的作用($P < 0.05$); ②相关蛋白 mRNA 表达: 甲萘醌 7 组比对照组能表达更多的碱性磷酸酶和钙结节。质量浓度 10^{-4} g/L 的甲萘醌 7 能上调骨钙素、骨桥蛋白和 Runx2 蛋白 mRNA 的表达($P < 0.05$); ③结果证实, 甲萘醌 7 能诱导骨髓基质细胞向成骨方向分化, 可用于骨组织工程中种子细胞的诱导剂。

关键词:

甲萘醌 7; 碱性成纤维细胞; 干细胞; 骨髓干细胞; 骨髓基质细胞; 细胞增殖; 碱性磷酸酶; 成骨分化; 骨组织工程

主题词:

组织工程; 细胞增殖; 碱性磷酸酶

基金资助:

江西省科技计划项目(20134BBG00009)

Menadione-7 induces the differentiation of rat bone marrow stromal cells *in vitro*

Xu Bing, Liu Yuan (Department of General Medicine, People's Hospital of Longhua District, Shenzhen 518109, Guangdong Province, China)

Xu Bing, Attending physician, Department of General Medicine, People's Hospital of Longhua District, Shenzhen 518109, Guangdong Province, China

Abstract

BACKGROUND: The current research on menadione 7 mainly focuses on its anti-osteoporosis effect, and its role in rat bone marrow stromal cells *in vitro* culture system is unclear.

OBJECTIVE: To investigate the effect of menadione-7 on the proliferation and differentiation of Bone marrow stromal cells, and to provide theoretical basis for the application of menadione-7 in bone tissue engineering.

METHODS: Bone marrow stromal cells were obtained from rats by surgery. After cultured *in vitro*, bone marrow stromal cells were incubated in cell culture dishes. The proliferation of bone marrow stromal cells was induced by 10^{-6} , 10^{-5} and 10^{-4} g/L menadione-7 and 100 μ g/L basic fibroblast growth factor (bFGF). The corresponding absorbance value of bone marrow stromal cells was detected in each group. The levels of alkaline phosphatase

Corresponding author: Liu Yuan, Department of General Medicine, People's Hospital of Longhua District, Shenzhen 518109, Guangdong Province, China



and the number of calcium nodules in bone marrow stromal cells were detected at 2, 4, 6 and 8 days, and the mRNA expression of osteocalcin, osteopontin and Runx2 was detected at 4, 6 and 8 days.

RESULTS AND CONCLUSION: Bone marrow stromal cells induced by menadione-7 proliferated well, and the cell proliferation could be promoted by different concentrations of menadione-7 and bFGF ($P < 0.05$). More alkaline phosphatase and calcium nodules were expressed in menadione-7 groups than the control group. The mRNA expression of osteocalcin, osteopontin and Runx2 could be significantly up-regulated by 10^{-4} g/L menadione-7 ($P < 0.05$). To conclude, bone marrow stromal cells can be induced by menadione-7 into osteogenic differentiation and menadione-7 can be used as an inducer for seed cells in bone tissue engineering.

Subject headings: Tissue Engineering; Cell Proliferation; Alkaline Phosphatase

Funding: the Science and Technology Plan of Jiangxi Province, No. 20134BBG00009

0 引言 Introduction

目前骨组织工程中诱导剂的选择至关重要, 诱导剂可控制种子细胞分化方向和增殖效率。以往研究主要的诱导剂有骨形态发生蛋白、物理因素、中药提取物等, 目前尚无甲萘醌7用于骨组织工程中的相关报道。

甲萘醌7是维生素K2最广泛、最强大的活性成分, 有抗骨质疏松等作用, 但关于其在体外对骨髓基质细胞的诱导作用尚未见报道。实验拟探讨甲萘醌7诱导骨髓基质细胞增殖和定向分化的作用, 并探讨其最佳浓度和条件, 旨在研究甲萘醌7运用于体外细胞培养体系中的可能性, 为甲萘醌7作为诱导剂定向诱导骨髓基质细胞成骨分化奠定基础, 为骨组织工程的诱导剂提供了新的选择。

实验所选用骨髓基质细胞, 具有潜在的分化能力。但是分化方向在不同的诱导剂下各不相同, 不同刺激条件下可能分化为神经细胞、成骨细胞或软骨细胞, 骨髓基质细胞取材容易, 体外培养后可快速扩增并用于骨组织工程中。同时骨髓基质细胞因是未分化细胞, 体外诱导后可多次传代培养, 能迅速获得骨组织工程中的种子细胞。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学实验。

1.2 时间及地点 于2017年4至9月在南方医科大学生物实验室完成。

1.3 材料

实验动物: 健康2月龄SD大鼠2只, 体质量15-25 g, 雌雄不限, 由南方医科大学动物中心提供, 许可证号: SCXK 20090002。

1.4 实验方法

1.4.1 骨髓基质细胞培养 取2月龄SD大鼠, 手术中去除胫骨和股骨附着的软组织, 并去除骺软骨, 露出髓腔后用无菌注射器抽含有胎牛血清及MEM培养液的混合液反复冲洗髓腔, 冲洗出髓腔液并转移入离心管中, 高速离心8 min, 弃上清液。沉淀物加入体积分数15%的胎牛血清和MEM培养液反复吹打, 使细胞悬浮。

计数细胞数量后, 每个培养瓶中装约 10^5 的细胞量, 细胞置于恒温细胞培养箱中培养, 每隔2 d换液1次。约半个月后细胞贴壁形成单层细胞, 用胰蛋白酶消化并传代培养。取第3代细胞用于实验。

1.4.2 甲萘醌7对骨髓基质细胞增殖的影响 采用MTT法

检测, 将大鼠骨髓基质细胞接种入3块24孔板中, 细胞浓度 10^4 /孔。实验分为5组, 实验组根据质量浓度不同包括3组, 分别加入不同质量浓度(10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} g/L)的甲萘醌7(上海宝曼生物科技有限公司), 对照组加入等体积的生理盐水, 阳性对照的碱性成纤维细胞生长因子组加入质量浓度100 μ g/L的碱性成纤维细胞生长因子, 调零孔仅加入培养基、MTT和二甲基亚砜, 每组均设3个复孔。

分别在第1, 4, 7, 10天检测细胞增殖情况, 检测时弃上清后加入二甲基亚砜约150 μ L入每孔, 检测细胞在490 nm处的吸光度值并减去调零孔数值获得最终吸光度值, 取均值。

1.4.3 甲萘醌7诱导骨髓基质细胞碱性磷酸酶和钙结节的表达 用第3代骨髓基质细胞接种入24孔板后培养, 实验分为3组, 甲萘醌7组(加入质量浓度 10^{-4} g/L的甲萘醌7), 阳性对照为碱性成纤维细胞生长因子组(加入质量浓度100 μ g/L的碱性成纤维细胞生长因子)和对照组(加入生理盐水)。实验中用碱性磷酸酶试剂盒检测骨髓基质细胞在第1, 4, 7, 10天的碱性磷酸酶的表达, 同时检测钙结节的数量(Von Kossa染色法), 每组均检测3次, 取均值。

碱性磷酸酶检测: ①500 μ L PBS冲洗2次, 每次3 min; ②40 g/L多聚甲醛固定8 min; ③PBS洗2遍; ④用吸附纸吸取残液, 封口膜上, 加碱性磷酸酶底物50 μ L在载玻片上, 室温下放30 min; ⑤PBS洗2遍; ⑥体积分数80%甘油封固; ⑦显微拍照。

钙结节的检测: ①PBS冲洗2次, 每次3 min; ②多聚甲醛固定8 min; ③蒸馏水冲洗2次; ④体积分数5%硝酸银紫外下照20 min; ⑤蒸馏水冲洗2次; ⑥入体积分数2%硫代硫酸钠5 min; ⑦水洗封固。

1.4.4 甲萘醌7诱导骨髓基质细胞成骨相应基因的表达 骨髓基质细胞按照 10^7 L⁻¹的细胞浓度接种于细胞培养板中, 随机分成实验组和对照组, 实验组各孔均加入 10^{-4} g/L的甲萘醌7, 对照组仅加入细胞培养液, 然后于第4, 6, 8天收集细胞, 检测骨桥蛋白、Runx2和骨钙素的mRNA含量, 实验重复检测3次。

去除细胞培养液, 贴壁细胞用PBS洗涤2次, 各组细胞的总RNA均用Trizol法裂解细胞并提取。溶解细胞后, 加入300 μ L氯仿浸泡5 min, 用离心机离心15 min(10 000 r/min)。离心后再2次分别用异丙醇及体积分数75%乙醇洗涤并离心, 每次离心5 min。加入40 μ L的ddH₂O溶解沉淀, 低温

表2 甲萘醌7促进骨髓基质细胞增殖

($\bar{x} \pm s$, $n=3$, 吸光度值)

Table 2 Proliferation of bone marrow stromal cells induced by different concentrations of menadione-7

培养时间	10 ⁻⁴ g/L 甲萘醌7组	10 ⁻⁵ g/L 甲萘醌7组	10 ⁻⁶ g/L 甲萘醌7组	对照组	碱性成纤维细胞生长因子组
2 d	0.32±0.03 ^{abc}	0.21±0.05 ^{bc}	0.15±0.03 ^c	0.06±0.03	0.33±0.03 ^{abc}
4 d	0.48±0.05 ^{abc}	0.34±0.04 ^{bc}	0.19±0.05 ^c	0.17±0.07	0.47±0.05 ^{abc}
6 d	0.77±0.09 ^{abc}	0.57±0.06 ^{bc}	0.27±0.06 ^c	0.21±0.05	0.75±0.05 ^{abc}
8 d	0.97±0.02 ^{abc}	0.66±0.05 ^{bc}	0.34±0.06 ^c	0.32±0.04	0.96±0.09 ^{abc}

表注: 与10⁻⁵ g/L 甲萘醌7组对比, ^a $P < 0.05$; 与10⁻⁶ g/L 甲萘醌7组相比, ^b $P < 0.05$; 与对照组相比, ^c $P < 0.05$ 。

表4 各组骨钙素、骨桥蛋白和Runx2的mRNA表达量

($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 4 The mRNA expression of osteocalcin, osteopontin and Runx2 in different groups

组别	培养第4天			培养第6天			培养第8天		
	骨钙素	骨桥蛋白	Runx2	骨钙素	骨桥蛋白	Runx2	骨钙素	骨桥蛋白	Runx2
10 ⁻⁴ g/L 甲萘醌7组	1.19±0.22 ^a	1.22±0.12 ^a	0.96±0.21 ^a	2.19±0.16 ^a	2.08±0.17 ^a	1.91±0.27 ^a	3.47±1.86 ^a	3.49±0.19 ^a	2.43±0.25 ^a
碱性成纤维细胞生长因子组	1.46±0.67 ^a	1.35±0.18 ^a	1.08±0.28 ^a	2.12±0.15 ^a	2.11±0.17 ^a	1.88±0.20 ^a	3.67±0.15 ^a	3.68±0.15 ^a	2.58±0.16 ^a
对照组	0.39±0.88	0.28±0.098	0.46±0.13	0.33±0.054	0.42±0.06	0.72±0.14	0.99±0.11	0.88±0.12	1.17±0.34

表注: 与对照组相比, ^a $P < 0.05$ 。

表1 PCR引物序列

Table 1 PCR primer sequences

基因	引物序列(5'-3')	片段长度
β-actin	正义: ATG TAC AAT GTG CTG TGT CTC GC	629 bp
	反义: TTC AGA GCT CTT GTG CAG GCA GGA	
Runx2	正义: ATG GAA ACC TGA ACT AAG GTT G	125 bp
	反义: TTC ACT TCT GCG TCT GCG TCT GGT GAT A	
骨桥蛋白	正义: AGA CGG TGT GTG CAT AGC	487 bp
	反义: TGC CTA TAC GAT CTG TGT CC	
骨钙素	正义: TCA CAC ATG AGC TGA TGA CC	414 bp
	反义: CCA CCA TCA TCA AGT GAC TG	

表3 不同组碱性磷酸酶表达量($n=3$)及钙结节数量($n=6$)变化 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Expression of alkaline phosphatase and the number of calcium nodules in different groups

指标	培养时间	10 ⁻⁴ g/L 甲萘醌7组	碱性成纤维细胞生长因子组	对照组
碱性磷酸酶水平	2 d	5.357±0.37 ^a	5.34±0.19 ^a	1.15±0.21
	4 d	11.01±0.88 ^a	10.59±1.14 ^a	2.99±0.46
	6 d	14.95±1.21 ^a	14.87±1.19 ^a	5.45±2.46
	8 d	19.32±1.76 ^a	20.11±1.76 ^a	8.59±1.18
钙结节数量	2 d	9.66±1.27 ^a	9.92±1.25 ^a	2.9±0.89
	4 d	15.73±2.23 ^a	16.01±1.58 ^a	5.1±1.21
	6 d	25.02±3.79 ^a	24.77±1.96 ^a	6.57±1.76
	8 d	40.56±2.71 ^a	39.97±2.61 ^a	8.93±2.21

表注: 与对照组相比, ^a $P < 0.05$ 。

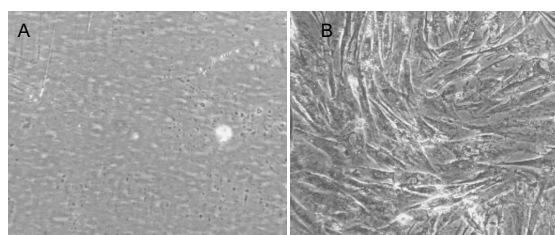


图1 甲萘醌7对骨髓基质细胞的诱导分化作用

Figure 1 Menadione-7 induces the differentiation of rat bone marrow stromal cells

图注: 图A为原代骨髓基质细胞取材后, 细胞细小呈梭形, 细胞部分贴壁, 细胞上面有悬浮破碎杂质(培养第3天, $\times 20$); B为甲萘醌7诱导后形成的成骨细胞, 细胞集落样生长, 增殖活跃(培养第4天, $\times 100$)。

保存备用。按照反转录试剂盒说明合成cDNA, 低温保存备用。

建立PCR反应体系并扩增, 采用Delta-delta Ct法计算骨桥蛋白、Runx2和骨钙素的表达情况, 引物信息(上海英拜生物科技有限公司设计)见表1。

1.5 主要观察指标 各组骨钙素、骨桥蛋白和Runx2的mRNA表达量。

1.6 统计学分析 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 不同组间数据的比较采用单因素方差分析和LSD法, $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 甲萘醌7对骨髓基质细胞的诱导分化作用(MTT法)

原代的大鼠骨髓基质细胞细小, 骨髓基质碎片散在其中, 细胞未贴壁时细胞形态不明显(图1A), 经过甲萘醌7诱导培养4 d后, 细胞贴壁, 细胞逐步聚集成片状, 细胞呈梭形, 细胞总体排列有一定方向性, 细胞增殖活跃(图1B)。

不同质量浓度的甲萘醌7与对照组相比均有促进骨髓基质细胞增殖的作用, 其促进细胞增殖的活性在第2, 4, 6, 8天均存在。与阳性对照组碱性成纤维细胞生长因子相比, 其促进细胞增殖作用无差异($P > 0.05$); 不同时间点, 甲萘醌7组间对比10⁻⁴ g/L 甲萘醌7有最大的促进作用($P < 0.05$; 表2)。

2.2 甲萘醌7诱导骨髓基质细胞碱性磷酸酶和钙结节的表达 使用质量浓度10⁻⁴ g/L的甲萘醌7在第2, 4, 6, 8天均能有效

的诱导骨髓基质细胞碱性磷酸酶的表达和钙结节的形成。不同时间点碱性磷酸酶和钙结节数量均比对照组高(表3)。

2.3 甲萘醌7诱导骨髓基质细胞成骨特异性基因的表达 甲萘醌7诱导骨髓基质细胞增殖和分化为成骨细胞特异性基因表达情况如表4结果显示, 甲萘醌7组与对照组相比其第4, 6, 8天骨髓基质细胞中的Runx2、骨钙素、骨桥蛋白的mRNA的表达量均更高($P < 0.05$)。说明甲萘醌7能促进骨髓基质细胞向成骨方向分化。

3 讨论 Discussion

目前因骨髓基质细胞的解剖和生物学特性, 越来越多的组织工程选用其为种子细胞。骨髓基质细胞是位于骨髓腔内, 有大量骨髓基质细胞用于骨组织工程的研究证实其可被诱导成骨用于组织工程中^[1-4], 其内有各类细胞如脂肪细胞、成骨细胞、破骨细胞和软骨细胞的前体细胞^[1, 5-6], 在不同的诱导情况下, 骨髓基质细胞有不同的分化能力和分化方向, 可被诱导成为成骨细胞、破骨细胞和脂肪细胞等^[7-10]。

有研究证实骨髓基质细胞包括定向性骨祖细胞和诱导性骨祖细胞, 其中定向骨祖细胞能定向分化为成骨细胞、破骨细胞或软骨细胞, 诱导性骨祖细胞在特定的刺激因子的作用下可被动的分化为特定的细胞体系^[11]。因此, 探讨可行的诱导因子, 研究其对骨髓基质细胞定向诱导分化能力对骨组织工程有重要的意义。

实验发现甲萘醌7可促进骨髓基质细胞增殖。关于甲萘醌7对骨髓基质细胞的增殖相关的研究目前比较少, 实验发现甲萘醌7组比对照组在不同时间点吸光度值均更高, 说明其有明显促进骨髓基质细胞增殖的作用, 同时和碱性成纤维细胞生长因子组无差异, 说明其对细胞促增殖作用强度和碱性成纤维细胞生长因子类似。

成骨细胞表达的特异性物质包括碱性磷酸酶和钙结节, 表达的特异性基因包括Runx2、骨钙素、骨桥蛋白等, 实验通过检测以上特异成骨标记物, 发现甲萘醌7组和对照组对比明显增高, 同时和碱性成纤维细胞生长因子组无统计学差异, 说明甲萘醌7有特异性诱导骨髓基质细胞分化为成骨细胞的作用。

实验选用的阳性对照物碱性成纤维细胞生长因子对骨髓基质细胞的促进增殖作用已经被广泛证实^[12-16], 通过阳性对照物的对比研究进一步论证了甲萘醌7对骨髓基质细胞的促增殖和促成骨分化作用。

目前特定诱导骨髓基质细胞分化有多种方式, 主要包括物理因素和生物因子因素。物理因素包括冲击波及人工材料等^[17-19], 生物因子因素包括中成药、地塞米松及阿司匹林等^[20-24]。有研究用巴戟天的提取物作用于骨髓基质细胞, 发现能诱导其向成骨细胞分化^[24]。

张雷等^[25]通过提取Wistar大鼠骨髓基质细胞, 并用黄芩甙体外诱导扩增, 通过蛋白质印迹及RT-PCR等实验证

实黄芩甙可在体外培养体系中刺激大鼠骨髓基质细胞向神经样细胞分化。有学者通过建立大鼠SD大鼠模型, 通过油红O染色法及RT-PCR证明大黄素能诱导骨髓基质细胞向脂肪细胞分化^[26]。

甲萘醌7是和骨代谢密切相关并且有多种功效的物质, 其又名七烯甲萘醌(MK-7)或者维生素K2(35)^[27], 是维生素K2中的最强大、最广泛的活性成分。甲萘醌7有多种功效, 包括抗癌, 抗骨质疏松及预防高血压等^[28-32]。

甲萘醌7主要是调节钙的代谢异常来抗骨质疏松的。有多种存在骨组织中的蛋白是依赖维生素K的, 常见的包括S蛋白和骨钙素等^[33], 骨钙素别名是骨钙蛋白, 有偶联骨形成和骨吸收、调节破骨细胞分化、调节破骨细胞活性等的生理作用^[34]。有研究证实, 低羧化的骨钙素含量越高则骨密度越低, 增加维生素K2能降低低羧化骨钙素含量, 从而改变骨的物理特性, 引起骨质更加致密, 硬度更强和抗疲劳性更好。目前甲萘醌7用于诱导骨髓基质细胞尚未见相关的研究和报道, 由于其和骨代谢密切相关, 探讨其对骨髓基质细胞在体外培养体系中的相互作用, 并用于定向诱导细胞分化有重要的意义。

实验认为甲萘醌7可作用刺激因子用于骨组织工程中。甲萘醌7作为诱导剂用于骨组织工程未见相关报道, 实验经过研究, 发现甲萘醌7能促进骨髓基质细胞向成骨方向分化, 且其诱导分化能力和碱性成纤维细胞生长因子无明显差异。因此, 甲萘醌7可作为组织工程的待选诱导剂, 实验通过MTT及PCR等方法, 论证了甲萘醌7在体外特定条件下对骨髓基质细胞相关作用, 为骨组织工程选用良好有效的诱导剂奠定了理论基础。实验选用的骨髓基质细胞因取材容易、不定向分化等生物学特点, 可作为骨组织工程的待选种子细胞。

作者贡献: 课题资料收集、实验设计、实验评估和实验实施均由第一作者和通讯作者共同完成。

经费支持: 该文章接受了“江西省科技计划项目(20134BBG00009)”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, 不存在利益冲突。

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, 实验方案中有关动物伦理问题已经龙华人民医院实验动物伦理委员会讨论批准。文章的撰写与编辑修改后文章遵守了国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和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。

作者声明: 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。

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3.0”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] Kagami H, Agata H, Inoue M, et al. The use of bone marrow stromal cells (bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells) for alveolar bone tissue engineering: basic science to clinical translation. *Tissue Eng Part B Rev*. 2014;20:229-232.
- [2] Ohgushi H. Osteogenically differentiated mesenchymal stem cells and ceramics for bone tissue engineering. *Exp Opin Biol Ther*. 2014;14:197-208.
- [3] Polymeri A, Giannobile WV, Kaigler D. Bone Marrow Stromal Stem Cells in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Horm Metab Res*. 2016;48:700-713.
- [4] Yang M, Zhang H, Gangolli R. Advances of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and dental tissue in craniofacial tissue engineering. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2014;9(3):150-161.
- [5] Hoch AI, Leach JK. Concise review: optimizing expansion of bone marrow mesenchymal stem/stromal cells for clinical applications. *Stem Cells Transl Med*. 2014;3(5):643-652.
- [6] Mendez-Ferrer S, Scadden DT, Sanchez-Aguilera A. Bone marrow stem cells: current and emerging concepts. *Ann N Y Acad Sci*. 2015;1335:32-44.
- [7] Anthony BA, Link DC. Regulation of hematopoietic stem cells by bone marrow stromal cells. *Trends Immunol*. 2014;35:32-37.
- [8] Do HV, Loke WT, Kee I, et al. Characterization of Insulin-Secreting Porcine Bone Marrow Stromal Cells Ex Vivo and Autologous Cell Therapy In Vivo. *Cell Transplant*. 2015;24:1205-1220.
- [9] Ozdal-Kurt F, Tuglu I, Vatansever HS, et al. The effect of autologous bone marrow stromal cells differentiated on scaffolds for canine tibial bone reconstruction. *Biotech Histochem*. 2015;90:516-528.
- [10] Zhou BO, Yue R, Murphy MM, et al. Leptin-receptor-expressing mesenchymal stromal cells represent the main source of bone formed by adult bone marrow. *Cell Stem Cell*. 2014;15:154-168.
- [11] Aubin JE. Osteoprogenitor cell frequency in rat bone marrow stromal populations: role for heterotypic cell-cell interactions in osteoblast differentiation. *J Cell Biochem*. 1999;72:396-410.
- [12] 常祺, 刘建, 胡蕴玉, 等. bFGF对兔骨髓基质细胞VEGF因子表达及细胞生物行为的影响[J]. 第四军医大学学报, 2003, 24(19): 1748-1751.
- [13] 李春明, 杨春艳, 王鑫, 等. bFGF基因修饰的骨髓基质细胞复合多孔矿化Bio-Oss胶原修复下颌骨缺损的实验研究[J]. 实用口腔医学杂志, 2008, 24(4): 470-474.
- [14] 徐忠世, 肖德明, 林博文, 等. bFGF转染骨髓基质细胞培养及修复软骨缺损的动物实验[J]. 南方医科大学学报, 2009, 29(6): 1123-1126.
- [15] Bai Y, Li P, Yin G, et al. BMP-2, VEGF and bFGF synergistically promote the osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biotechnol Lett*. 2013;35(5):301-308.
- [16] Yuan S, Pan Q, Fu CJ, et al. Effect of growth factors (BMP-4/7 & bFGF) on proliferation & osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells. *Indian J Med Res*. 2013;138:104-110.
- [17] 胡军, 邢达, 张爱斌, 等. 冲击波诱导人骨髓基质细胞体内成骨研究[J]. 生物化学与生物物理进展, 2006, 33(5): 452-457.
- [18] 金小岚, 郎红梅, 万勇, 等. 不同氧浓度对骨髓基质细胞向成骨细胞分化的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26(5): 982-986.
- [19] 张海峰, 杜子婧, 姜闻博, 等. 3D打印PLA-HA复合材料与骨髓基质细胞的相容性研究[J]. 组织工程与重建外科杂志, 2015, 11(6): 349-353.
- [20] 杜朝阳, 戴彩华. 环孢素A联合康力龙对慢性再生障碍性贫血患者骨髓基质细胞相关细胞因子的影响[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(4): 955-957.
- [21] 杜密, 潘婉, 杨丕山, 等. 阿司匹林对小鼠骨髓基质细胞生物活性的影响[J]. 中华口腔医学杂志, 2016, 51(3): 160-165.
- [22] 贾延, 杨于嘉, 周燕, 等. 黄芩甙诱导大鼠骨髓基质细胞向神经细胞分化的研究[J]. 中华医学杂志, 2002, 82(19): 1337-1341.
- [23] 万蕾蕾, 刘宏伟. β -磷酸三钙复合骨髓基质细胞构建组织工程骨的实验研究[J]. 口腔医学研究, 2010, 26(4): 497-500.
- [24] 王和鸣, 王力, 李楠. 巴戟天对骨髓基质细胞向成骨细胞分化影响的实验研究[J]. 福建中医学报, 2004, 14(3): 16-20.
- [25] 张雷, 张媛, 倪红霞, 等. 黄芩甙体外诱导大鼠骨髓基质细胞向神经干细胞的分化[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(27): 5054-5057.
- [26] 刘钰瑜, 崔燎, 吴铁, 等. 大黄素对体外大鼠骨髓基质细胞向脂肪细胞方向分化的影响[J]. 中国药理学通报, 2005, 21(7): 842-847.
- [27] 李拖平, 郭梅, 王娜. 枯草杆菌发酵生产VK2的技术工艺条件初探[J]. 食品科学, 2008, 20(11): 2354-2357.
- [28] 蒋雨薇, 饶智国. 维生素 K2 抗肿瘤作用的研究进展[J]. 实用癌症杂志, 2015, 30(1): 156-158.
- [29] 应卫星, 陈华, 李荣洲. 维生素 K2 联合苯那普利对裸鼠胃癌的治疗作用及其机制的研究[J]. 中国药理学杂志, 2012, 47(3): 186-189.
- [30] 周小芸, 王艳红, 薛琼. 维生素K2干预肝癌的实验研究[J]. 中国临床医学, 2009, 16(1): 75-79.
- [31] 雷泽, 付正启, 木晓云. 维生素 K2-新型骨质疏松防治药物[J]. 中国骨质疏松杂志, 2010, 16(1): 2063-2066.
- [32] 邹志强. 维生素 K2 的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2005, 11(3): 389-392.
- [33] Shearer MJ. Vitamin K and vitamin K-dependent protein. *Br J Haematol*. 1990;75(2):156-162.
- [34] Ferland G. The Vitamin K-dependent protein: an update. *Nutr Rev*. 1998;56(8):223-230.